

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

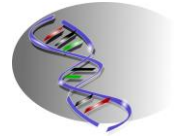
---

**MARIANA OLIVEIRA GOMES**

**Relações Filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*), nucleares (*28S* e *18S*) e informações morfológicas**

São José do Rio Preto, SP

2013



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

---

**MARIANA OLIVEIRA GOMES**

**Relações Filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*), nucleares (*28S* e *18S*) e informações morfológicas**

Tese apresentada, como parte dos requisitos, para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Genética

Orientadora: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto, SP

2013

Gomes, Mariana Oliveira.

Relações filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (Cyt b, COI e 16S), nucleares (28S e 18S) e informações morfológicas / Mariana Oliveira Gomes. -- São José do Rio Preto, 2013  
106 f. : il., tabs

Orientador: Mary Massumi Itoyama

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Inseto – Filogenia. 3. Hemiptera. 4. Inseto – Morfologia. 5. DNA mitocondrial. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.7:576.12

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

MARIANA OLIVEIRA GOMES

**Relações Filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*), nucleares (*28S* e *18S*) e informações morfológicas**

Tese apresentada, como parte dos requisitos, para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Genética

Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

UNESP - São José do Rio Preto

Orientadora

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

UNES – Rio Claro

Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida

UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

FAMERP - São José do Rio Preto

Profa. Dra. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira

UNESP - São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto, SP

2013

Dedico este trabalho ao meu pai, Antonio Marques Gomes (*in memoriam*), e minha mãe, Celeste da Silva Oliveira Gomes que me ensinaram a viver com dignidade e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos. Ao meu irmão-amigo, Fellipe Oliveira Gomes que em todos os momentos esteve ao meu lado e, ao meu companheiro Mateus Bertoni Siminato que me apoiou todos os dias sempre com muita compreensão e amor.

## **Agradecimentos**

Desafio tão difícil quanto realizar e escrever a Tese foi demonstrar em poucas páginas o sentimento e as pessoas que fizeram parte desta trajetória. Embora uma tese tenha finalidade acadêmica há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao bom Deus, a Graça da vida, de ter oportunidade de realizar este trabalho e chegar até aqui.

À minha orientadora Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama pela oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa, pelo incentivo, pelos ensinamentos e por ter me acolhido.

À Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi, pela orientação no Mestrado, além de muito ter me ensinado e participar da minha formação.

Ao programa da Pós-Graduação em Genética, coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Marcia Aparecida Carareto, por todo auxílio e atenção.

Aos Professores da Pós-Graduação em Genética pelo conhecimento transmitido.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, com a bolsa de Doutorado.

À direção do IBILCE e ao Departamento de Biologia, pelas condições materiais que permitiram a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Morielle Versute e ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto pelas sugestões na Banca de Qualificação.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP, especialmente a Silvia Emiko Kazama e à Rosemar Rosa Carvalho Brena, pela boa-vontade e atenção com a parte burocrática.

À Damaris dos Santos Martins por tornar nosso ambiente de trabalho mais limpo e agradável.

Ao funcionário do meio de cultura Sebastião Dias Barbosa (Tião), por sempre se dispor.

À secretaria do Departamento, Simone Carvalho Fernandes, pela colaboração e disposição.

Aos meus Amigos de Laboratório (Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos): SANDRA Regina de Carvalho Marchesin, HEDERSON Vinicius de Souza, MARCIA Maria Urbanin Castanhole, LUIS Lenin Vicente Pereira, TATIANI de Seni Firmino de Souza, CECILIA Artico Banho. Muito Obrigada pela convivência agradável, trocas de idéia, e ajuda.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, Elias Alberto Gutierrez Carnellosi, Adriana Granzotto, Leiza Viola Penariol, Aline Cristina Targa Cadamuro e Ana Carolina Negrin (Lerê). Meu Doutorado foi muito mais agradável com vossas companhias e auxílios.

A todos meus AMIGOS que alegraram meus finais de semana.

Às crianças, meus amores: Ana Beatriz, Otavio, Pedro Gabriel, Maria Carolina, Pedro Henrique, Vinicius.

Aos meus lindos afilhados, presente de Deus, Vítor e minha sobrinha Alícia.

A toda minha família, que apesar da distância, sempre torceu por mim.

Ao meu irmão, por ser meu amigo em todos os momentos e esteve sempre disposto.

À Bruna Villas Boas, agora Gomes, minha cunhada, pela ajuda e torcida.

À minha mãe, pela ajuda em todos os momentos e por me fazer reconhecer o valor da educação.

Ao meu Marido, Mateus Bertoni Siminato, por sempre confiar em mim, pela compreensão e companheirismo.

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

*Augusto Branco*



## Resumo

Os Heteroptera possuem grande número de espécies descritas, aproximadamente, 40.000, além de habitat diversificado e hábitos alimentares bem variáveis, pois, podem viver como parasitas de aves ou mamíferos, se alimentarem de estruturas de plantas, micélios de alguns fungos ou outros artrópodes. Apesar destes insetos possuírem importância econômica seus estudos ainda são poucos explorados, principalmente, com relação aos lobos testiculares e suas relações filogenéticas. Assim, o presente estudo teve por objetivo inferir e entender as relações filogenéticas de espécies de Heteroptera pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae, a partir dos fragmentos dos genes mitocondriais (*COI*, *Cyt b* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*) e de dados moleculares associados com dados morfológicos e citogenéticos. A partir das análises foi possível identificar algumas relações entre as famílias, tribos e gêneros, demonstrando a eficiência dos genes e metodologias escolhidas. As famílias formam dois clados e esses formam grupo irmão, na maioria das análises. Analisando a família Coreidae observamos na maioria das análises, que formam agrupamentos monofiléticos. Quanto à família Pentatomidae, em todas as análises confirmaram sua monofilia. Observamos o agrupamento constante de espécies da mesma tribo e também agrupamentos congêneros, com altos valores de *bootstrap*. Porém, agrupamentos entre espécies de mesma família, porém de tribos diferentes ainda merecem ser melhor estudados e explorados. Foi observado que com a inserção de dados morfológicos e citogenéticos houve uma melhor resolução dos resultados, principalmente, entre as tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carpocorini (Pentatomidae). Com a análise evolutiva foi observado que algumas espécies agrupadas possuem características morfológicas mais semelhantes com espécies de outras tribos do que com seu grupo. Com esta análise foi possível identificar as relações entre as famílias, tribos e gênero e algumas semelhanças entre as espécies de diferentes tribos agrupadas, porém, há necessidade de um maior número de espécies e de caracteres envolvidos, pois ainda existem inconsistências a serem resolvidas.

Palavras chaves: Coreidae, Pentatomidae, filogenia, morfologia testicular

## **Abstract**

The Heteroptera have large number of described species, about 40,000, and diverse habitat and alimentary habits variables and therefore can live as parasites of birds and mammals, feeding on plant structures, mycelia of fungi or other arthropods. Despite these insects possess economic importance their studies are still few explored mainly in relation to testicular lobes and their phylogenetic relationships. Thus, this study aimed to understand and infer the phylogenetic relationships of species of Heteroptera belonging to the families Coreidae and Pentatomidae, from the fragments of mitochondrial genes (*COI*, *Cyt b* and *16S*) and nuclear (*28S* and *18S*) and molecular data associated morphological data and cytogenetic data. From the analysis it was possible to identify some relationships between families, tribes and genera, demonstrating the efficiency of genes and methodologies chosen. Families form two clades and these form brother group, most analyzes. Analyzing family Coreidae observed in most analyzes that form monophyletic groups. As the family Pentatomidae in all analyzes confirmed its monophyly. Observed clustering constant species of the same tribe and also congeneric groups with high bootstrap values. However, groupings among species of the same family, but different tribes still deserve to be better studied and explored. It was observed that with the inclusion of morphological and cytogenetic there was a better resolution of the results, especially among the tribes Pentatomini, Chlorocorini and Carpocorini (Pentatomidae). With the evolutionary analysis it was observed that some species grouped morphological characteristics more similar to species of other tribes than with your group. With this analysis it is possible to identify the relationships between families, tribes and genera and some similarities between species of different tribes grouped, however, there is need for a greater number of species and characters involved, because there are still inconsistencies to be resolved.

Key words: Coreidae, Pentatomidae, phylogeny, testicular morphology

## SUMÁRIO

---

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1- Relação filogenética das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseada nas sequências dos genes mitocondriais (<i>Cyt b</i>, <i>COI</i> e <i>16S</i>) e nucleares (<i>28S</i> e <i>18S</i>) .....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2- Filogenias de espécies de Heteroptera baseadas em dados moleculares, morfológicos e citogenéticos.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3- Morphological Aspects of the testes of 18 species of terrestrial of Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil)</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 4- Meiotic behaviour of 18 species from eight families of terrestrial Heteroptera.....</b>	<b>76</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

---

## INTRODUÇÃO GERAL

A Subordem Heteroptera pertence ao Filo Arthropoda, a Classe Insecta e a Ordem Hemiptera (SCHUH; SLATER, 1995). Os Hemiptera são insetos exopterigotos e hemimetábolos e são divididos em quatro Subordens: Auchenorrhyncha, Heteroptera e Sternorrhyncha (CRYAN; URBAN, 2012).

Os Heteroptera possuem habitat diversificado, sendo que, a maioria das famílias ocorre em todos continentes (exceto na Antártica) e em muitas ilhas. Além da diversidade de seu habitat, os Heteroptera também possuem hábitos alimentares bem variáveis, pois, podem viver como parasitas de aves ou mamíferos, se alimentarem de estruturas de plantas, micélios de alguns fungos ou outros artrópodes. O grande número de espécies descritas, aproximadamente, 40.000, a variedade de habitat e a alimentação sugerem que esses animais têm um longo curso evolutivo (SCHUH; SLATER, 1995; WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Das sete Infraordens descritas para a Subordem Heteroptera (Cimicomorpha, Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha, Nepomorpha e Pentatomomorpha) (SCHUH; SLATER, 1995), algumas são consideradas nocivas como, por exemplo, alguns representantes de Cimicomorpha e Pentatomomorpha. Elas incluem, por exemplo, vetores *T. cruzi* que podem causar doenças como a Doença de Chagas e as pragas de culturas (grãos e pomares). Devido ao grande impacto econômico que esses animais provocam, os Heteroptera, também denominados de percevejos, se tornaram animais de grande importância econômica e, conseqüentemente fornecedores de uma rica fonte de informações biológicas. Apesar de serem considerados prejudiciais, também podem ser úteis como agentes de controle biológico, pois, se alimentam de alguns insetos que destroem várias plantas (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

A Infraordem Pentatomomorpha é constituída de cinco superfamílias (Aradoidea, Coreoidea, Lygaoidea, Pentatomoidea e Pyrrhocoroidea). As famílias Coreidae e Pentatomidae, objetos do presente estudo pertencem, respectivamente, às superfamílias Coreoidea e Pentatomoidea.

A família Coreidae é composta, aproximadamente, por 1.800 espécies que apresentam porte avantajado e de cores brilhantes. Outra característica é que a maioria das espécies, desta família, possui dilatação foliácea nas tíbias do par de pernas posteriores (SCHUH; SLATER, 1995).

A família Pentatomidae conta com, aproximadamente, 760 gêneros e 4.112 espécies é cosmopolita e apresenta uma maior diversidade nos trópicos, sendo uma das maiores famílias de Heteroptera em número de espécies. São insetos, exclusivamente, terrestres de tamanho variável entre 2 a 20 mm e corpo, geralmente, ovalado, com coloração escura, geralmente, castanha ou negra, embora possa ocorrer algumas espécies do grupo com uma coloração viva, às vezes, brilhante, e até iridescente. Esses insetos são conhecidos como Marias-fedidas devido à produção de um odor desagradável emitido pelos ductos das glândulas produtoras de cheiro, que se abrem na região da metapleura (SCHUH; SLATER, 1995; GRAZIA et al., 1999; SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Os indivíduos deste grupo são facilmente reconhecidos por terem antenas de cinco segmentos e escutelo grande e triangular. A grande maioria das espécies possui hábitos fitófagos, alimentando-se de diversas partes da planta. Entre os fitófagos há registros de várias espécies que constituem pragas de plantas cultivadas e, entre os predadores, algumas espécies têm ação efetiva como controladores biológicos de pragas (GRAZIA et al., 1999).

Apesar dessas famílias de Heteroptera, serem economicamente importantes, por exemplo, para a agricultura (pragas), seus estudos ainda são pouco explorados. Um exemplo refere-se a investigação da pigmentação da bainha peritoneal que reveste os testículos e lobos testiculares, que são compartimentos que formam os testículos. Espécies descritas na literatura podem apresentar bainha avermelhada (SOUZA et al., 2007a, b, c; 2008; 2009), amarelada (SOUZA et al., 2007a) ou sem coloração (SOUZA et al., 2007a; CASTANHOLE et al., 2008) e essas são as únicas informações referente a estas estruturas. Estudos referentes ao número de lobos testiculares indicam que podem variar de três a sete (SOUZA et al., 2007a, b,c; 2008; CASTANHOLE et al., 2008).

Uma outra informação é que somente em algumas espécies da família Pentatomidae há a presença de um lobo testicular com características diferentes dos demais, denominado de lobo *harlequin*. As subfamílias que, geralmente, apresentam este lobo são a Edessinae, a Pentatominae e a Discocephalinae (REBAGLIATTI et al., 2005). Outra diferença observada entre as espécies que possuem o lobo *harlequin*, é que o comportamento das células diferem, principalmente durante a metáfase/anáfase meiótica. Nestas fases os cromossomos podem ser condensados ou descondensados e, geralmente, essas células são poliplóides e se dividem irregularmente (SOUZA et al., 2007b).

Citogeneticamente, os estudos deste grupo são mais amplos, havendo descrições de peculiaridades como a presença de cromossomos holocêntricos (sem centrômero localizado), 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 (cromossomos são denominados telocinéticos, SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; MOTZKO; RUTHMANN, 1984; GONZALEZ-GARCIA et al., 1996); ocorrência de terminalização dos quiasmas (JOHN; KING, 1985), embora haja trabalhos que discutam este assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987); além de a primeira divisão meiótica ser reducional para os autossomos e equacional para os sexuais.

Esses insetos possuem além dos cromossomos autossomos, os sexuais com diversos sistemas cromossômicos do sexo (X0, XY e múltiplos cromossomos sexuais). Algumas espécies podem possuir também os m-cromossomos, os univalentes e os B. O comportamento meiótico desses cromossomos não autossômicos é altamente diferente (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000). Como regra, autossomos bivalentes são quiasmáticos (exceto para poucas espécies das famílias Saldidae (NOKKALA; NOKKALA, 1983); Nabidae (NOKKALA; NOKKALA, 1984); Miridae (NOKKALA; NOKKALA, 1986a); Anthocoridae (NOKKALA; NOKKALA, 1986b); e Microphysidae (NOKKALA; GROZEVA, 2000) e os bivalentes em forma de bastão orientam-se axialmente e segregam-se pré-reducionalmente. Por outro lado, os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e comportam-se como univalentes na meiose dos machos. Eles dividem-se equacionalmente na anáfase I e associam-se formando um pseudobivalente na meiose II. Entretanto, foi encontrado pré-redução dos cromossomos sexuais em células espécies da Família Tingidae (UESHIMA, 1979; GROZEVA; NOKKALA, 2001). Finalmente, os m-cromossomos, pequeno par de cromossomos presentes em algumas famílias, são também aquiasmáticos, mas associam-se na primeira divisão e segregam-se pré-reducionalmente (PAPESCHI et al., 2003).

Até a revisão de Rebagliati e colaboradores (2005), foram analisadas citogeneticamente mais de 1.200 espécies de Heteroptera pertencentes, a 42 famílias. O número de cromossomos diplóide varia de quatro (*Lethocerus* sp., Belostomatidae) a 80 (quatro espécies de *Lopidae*, Miridae).

Os estudos filogenéticos deste grupo ainda são escassos e as informações até o momento, para a monofilia de Heteroptera é normalmente assumida com base em evidências morfológicas e moleculares. No entanto, para os táxons das Infraordens de Heteroptera são consideradas três hipóteses alternativas, conforme a Figura 1 (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).

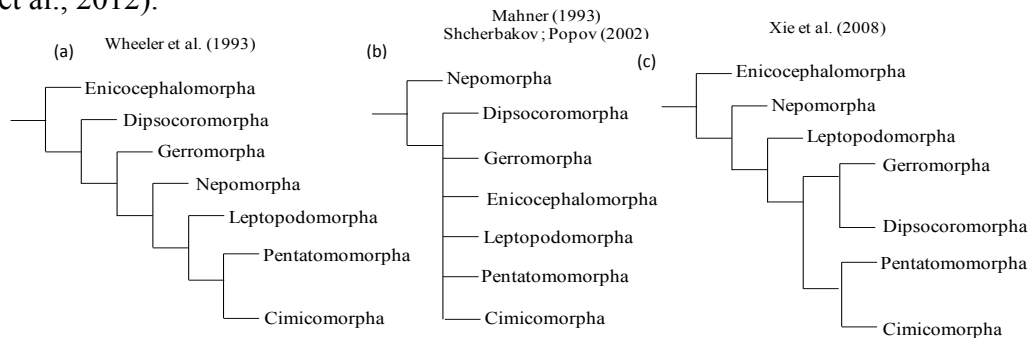


Figura 1. Filogenias de Heteroptera baseadas em a) Wheeler et al. (1993); b) Mahner (1993), Shcherbakov e Popov (2002); c) Xie et al. (2008).

A utilização de dados moleculares vem sendo feita com maior frequência em diversos estudos nos mais diferentes grupos taxonômicos, contribuindo para avanços consideráveis no conhecimento da biologia das espécies, ecologia, comportamento, genética e evolução das espécies (SUNNUCKS, 2000; AVISE, 2004). Isto porque as análises moleculares revelam, não somente detalhes do DNA, mas também condições outras variáveis, que podem esclarecer a base genética e o modo de transmissão podem ser precisamente especificados (AVISE, 2004).

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui vantagens nos estudos moleculares devido a maior abundância de cópias em comparação ao nuclear. Sendo assim, tecidos muito diminutos, com pouco DNA ou com DNA bastante degradado, podem ter seu DNA mitocondrial amplificado. Outra característica importante do mtDNA é a sua alta taxa de mutação que pode chegar a ser dez vezes superior à de um gene de cópia única nuclear (BUDOWLE et al., 2003).

A taxa de evolução é um dado importante na escolha do gene para resolver questões filogenéticas, taxonômicas e de genética de populações. No mtDNA, essa taxa não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mais rapidamente essas substituições de bases (SACCONE, 1994; HUA et al., 2008). No entanto, na pesquisa de eventos mais antigos como a formação de espécies, gêneros, famílias, os genes mais conservados podem ser bons indicadores (SACCONE, 1994). A ausência de recombinação e a herança materna aliados à alta taxa de evolução heterogênea entre seus genes, fazem com que o mtDNA seja um excelente marcador para estudos filogenéticos, taxonomia molecular e dos movimentos migratórios de populações ao redor do mundo (AVISE et al., 1987; 2000; SACCONE, 1994; HUA et al., 2008, 2009).

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região bem conservada e que se mostrou valioso para pesquisas de sistemática e filogenia de organismos próximos ou relacionados de forma distante e que não acumulam mutações independentemente, de cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, podendo ser tratada como um único gene (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006).

Poucos estudos moleculares vêm utilizando genes mitocondriais de Heteroptera para análises filogenéticas e a maioria se concentra na família Reduviidae que incluem os triatomídeos, possíveis vetores da Doença de Chagas (GARCIA; POWELL, 1998; LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2000; ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005; SCHUH et al., 2009; WEIRAUCH; MUNRO, 2009).

Com base nas informações mencionadas, a nossa hipótese é que com sequenciamento dos fragmentos dos genes *COI*, *Cyt b*, *16S*, *28S* e *18S* das espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, juntamente com as informações morfológicas testiculares e citogenéticas auxiliem na caracterização filogenética dessas duas famílias.



## **OBJETIVOS GERAIS**

Inferir relações filogenéticas de espécies de Heteroptera pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Estabelecer os relacionamentos filogenéticos das espécies estudadas utilizando análises de Parcimônia e Máxima Verossimilhança a partir:
  - a) dos fragmentos dos genes mitocondriais (*COI*, *Cyt b* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*) e;
  - b) dos dados moleculares, associados com dados morfológicos e citogenéticos.
  
- 2) Fornecer subsídios para as interpretações taxonômicas e filogenéticas do grupo.



**Relações filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências dos genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*)**

GOMES, M.O.<sup>1</sup>; CASTANHOLE, M.M.U<sup>1</sup>; SOUZA, H.V.<sup>1</sup>; ITOYAMA, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

mariana.oliveiragomes@gmail.com

**RESUMO**

Das sete infraordens descritas para a Subordem Heteroptera, Pentatomomorpha é uma das mais diversificada com, aproximadamente, 15.000 espécies amplamente distribuídas no mundo. Essa infraordem é constituída de cinco superfamílias, das quais destacamos Coreoidea e Pentatomoidea as quais pertencem, respectivamente, às famílias Coreidae e Pentatomidae objetos do presente estudo. Quanto às relações filogenéticas do grupo sabemos que a monofilia dos Heteroptera é bem discutida e documentada baseada tanto em análises morfológicas quanto em evidências moleculares. Porém, as relações entre os membros de Pentatomomorpha ainda permanecem em discussão, porque há poucos estudos filogenéticos sobre este grupo. As relações inferidas entre estes táxons são, principalmente, baseadas em análises morfológicas com inconsistências e controvérsias. Assim, observamos que as análises morfológicas apesar de importantes, não são suficientes para esclarecer certas controvérsias, sendo necessárias para este fim a inclusão de informações moleculares. No presente estudo pretendeu-se analisar as relações existentes entre 25 táxons das famílias Coreidae e Pentatomidae, baseadas em dados gerados a partir de sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*) utilizando as metodologias de Parcimônia e Máxima Verossimilhança. Com isso, observamos algumas filogenias robustas em relação às famílias, tribos e gêneros das espécies em análise, porém ainda sim, com algumas inconsistências. O presente estudo promoveu, pela primeira vez, a relação entre os membros de Coreidae e Pentatomidae, contribuindo, assim, para o início do entendimento desses táxons.

Palavras chaves: Hemiptera; percevejos; Filogenia.

## INTRODUÇÃO

A Subordem Heteroptera pertence ao Filo Arthropoda, a Classe Insecta e a Ordem Hemiptera (SCHUH; SLATER, 1995). Os Hemiptera são insetos exopterigotos e hemimetábolos e estão classificados em quatro Subordens: Auchenorrhyncha, Heteroptera, e Sternorrhyncha (CRYAN; URBAN, 2012).

Os Heteroptera possuem habitat diversificado, onde, a maioria das famílias estão distribuídas em todos os continentes (exceto na Antártica) e em muitas ilhas. Além de seu habitat, os Heteroptera possuem também hábitos alimentares bem variáveis, pois, podem viver como parasitas de aves ou mamíferos, se alimentarem de estruturas de plantas, micélios de alguns fungos ou parasitas de artrópodes. O grande número de espécies descritas, aproximadamente 40.000, a variedade de habitat e alimentação sugerem que esses animais possuem um longo tempo de historia evolutiva (SCHUH; SLATER, 1995; WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Dentre as sete infraordens descritas para a Subordem Heteroptera (Cimicomorpha, Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha, Nepomorpha e Pentatomomorpha), Pentatomomorpha é uma das que apresentam maior diversidade com, aproximadamente, 15.000 espécies e mais amplamente distribuídas (SCHUH; SLATER, 1995; YAO et al., 2012).

A Infraordem Pentatomomorpha é constituída de cinco superfamílias (Aradoidea, Coreoidea, Lygaoidea, Pentatomoidea e Pyrrhocoroidea). As famílias do presente estudo, Coreidae e Pentatomidae, pertencem, respectivamente, às superfamílias Coreoidea e Pentatomoidea (SCHUH; SLATER, 1995).

A família Coreidae é amplamente distribuída, embora seja mais abundante em regiões tropicais e subtropicais. São espécies de porte avantajado e cores brilhantes, sendo que a maioria das espécies desta família possui dilatação foliácea nas tíbias do par de pernas posteriores (SCHUH; SLATER, 1995).

A família Pentatomidae é cosmopolita e apresenta maior diversidade nos trópicos, sendo uma das maiores de Heteroptera em número de espécies. São insetos com o corpo geralmente ovalado, em sua maioria de a coloração escura, castanha ou negra e são conhecidos como Marias-fedidas devido à produção de um odor desagradável emitido pelos ductos das glândulas produtoras de cheiro, que se abrem na região da metapleura (SCHUH; SLATER, 1995; GRAZIA et al., 1999; SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Apesar dessas famílias de Heteroptera, serem economicamente importantes para a agricultura, pois, incluem espécies terrestres que em sua maioria são predadores e pragas, seus estudos ainda são pouco explorados (ZHANG, 1995; WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

A monofilia dos Heteroptera é bem discutida e documentada baseada tanto em análises morfológicas quanto evidências moleculares. Porém, as relações entre os membros de Pentatomomorpha ainda permanecem em discussão, isso porque há poucos estudos sobre a filogenia deste grupo. As relações existentes entre estes táxons que são, principalmente, baseadas em análises morfológicas, apesar de importantes, possuem inconsistências e controvérsias (SCHUH, 1979; WHEELER et al., 1993; LI et al., 2005; WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Essas diferentes filogenias discutem a monofilia dos membros de Pentatomomorpha. Alguns autores aceitam a hipótese de monofilia para Pentatomoidea e rejeitam para as demais superfamílias, outros, aceitam a monofilia tanto de Pentatomoidea quanto Coreoidea e rejeitam as demais (SCHAEFER, 1993; SWEET, 1996; HENRY, 1997; LI et al., 2005; XIE et al., 2005; HUA et al., 2008; YAO et al., 2012).

Com o sequenciamento de determinados genes, é possível avaliar, de forma direta, polimorfismos de DNA, que fornecem informações para inferências filogenéticas bem como para a avaliação das relações entre organismos e populações. Diferentes porções do DNA mitocondrial e nuclear evoluem em taxas distintas. Regiões que derivam rapidamente são adequadas para o estudo de organismos muito próximos e aquelas que são conservadas são mais apropriadas para comparações entre níveis taxonômicos superiores (ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005).

Souza (2013) estudou as relações entre os membros das famílias Coreidae e Pentatomidae, utilizando três genes (*COI*, *16S*, *18S* e *16S+18S*). O autor observou parafilia entre as tribos estudadas, concluiu que o *COI* pode ser informativo para o nível de gênero, enquanto o *16S* e *18S*, sozinhos ou concatenados resultam em grupos parafiléticos, em relação às tribos, em especial, o *18S*, devido sua alta conservação.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo discutir com base nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares DNA (*28S* e *18S*) as relações filogenéticas de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) a fim de observarmos as relações terminais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

O presente estudo foi realizado com 25 espécies de Heteroptera, sendo 12 da família Coreidae e 13 da Pentatomidae. As espécies utilizadas no presente estudo foram coletadas na região de São José do Rio Preto/SP (20° 49' 11" S, 49° 22' 46" O) e identificadas pelos Professores Doutores Jocélia Grazia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Luiz Antônio Alves Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro-Museu Nacional) e mantidas em etanol absoluto a -20°C para a posterior extração do DNA. Para cada espécie um exemplar foi armazenado como material testemunho (Tabela 1).

### Obtenção das Sequências

Para a obtenção das sequências referentes aos genes *Cyt b* e *28S* das 25 espécies foi realizada a extração do DNA genômico de modo individual, segundo o protocolo descrito por Cocciolone e Cone (1993), com modificações. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *Cyt b* e *28S* (Tabela 2), sendo que os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram, respectivamente, de 510 e 600 pb.

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um volume total de reação de 45 µL, utilizando 100 ng de DNA; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador do par; 100 mM de dNTP; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 a 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 unidade da DNA polimerase AmpliTaq Platinum™ (*Applied Biosystems*).

Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, 35 ciclos com desnaturação a 94°C, por 30 segundos, anelamento de 48 a 50°C, durante 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 6 minutos.

Os produtos de amplificação do gene foram purificados com o *Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE)* separadamente. As reações de sequenciamento foram realizadas em duas réplicas para cada espécie no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, de acordo com o protocolo para o *MegaBACE 1000*, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase)* e com os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação. Os eletroferogramas foram gerados pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*.

A validade das sequências obtidas foi verificada submetendo-as ao *Nucleotide-nucleotide Blast* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e pelo sequenciamento das fitas *Forward* e *Reverse*, para confirmação da região gênica.

Para os demais genes (*16S*, *COI* e *18S*) as sequências *Forward* e *Reverse* foram obtidas do trabalho de Souza (2013). Os números de acesso estão descritos na Tabela 1.

### **Grupo externo**

O grupo externo escolhido foi *Aphis gossypii* (GLOVER, 1877) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae), levando em consideração que é grupo-irmão de Heteroptera (CRYAN; URBAN, 2012). Outro fator levado em consideração foi a submissão deste insetos aos mesmos tratamentos que as outras amostras analisadas (condições de extração de DNA, PCR, purificação, sequenciamento e análise) (Tabela 2).

### **Alinhamento e Validação das Sequências**

As sequências de todos os genes (*Cyt b*, *COI*, *16S*, *18S* e *28S*) foram analisadas e manipuladas utilizando-se os programas *BioEdit*, *Sequence Alignment Editor v.7.0.4* (HALL, 1999) e *MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 5.05)* (KUMAR et al., 2003) e foram alinhadas com o programa *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994). As sequências consenso de cada espécie foram obtidas utilizando o programa MEGA, a partir das réplicas e das sequências *Forward* e *Reverse*. Após a obtenção das sequências consenso foi realizado o *Blast (Basic Local Alignment Search Tool)* para comparar informações de sequências biológicas e identificar se a sequência era a do gene em estudo (SCOTT; DARRYL, 2003).

### **Reconstrução Filogenética**

As análises de Parcimônia foram realizadas utilizando o Programa *WinClada v. 1.00.08* (NIXON, 2002) software *TNT* (GOLOBOFF et al., 2003) sendo realizadas nas seguintes condições: *replication number* 1000, *search per replicas* 20 e *strating trees per reps* 3. As árvores foram, posteriormente, avaliadas utilizando o programa *FIGTREE 1.3.1* (RAMBAUT, 2010).

Para as análises de Máxima Verossimilhança foi escolhido primeiramente o modelo de substituição nucleotídica apropriado utilizando programa *jModeltest version 0.1.1* (POSADA, 2008). Essa análise foi realizada utilizando a plataforma *Montpellier* (<http://www.atgc-montpellier.fr/>), com *perform bootstrap*: 1000 (GUINDON et al., 2010).

## RESULTADOS

### Características das sequências

Os resultados referem-se às análises das sequências dos genes mitocondriais *Cyt b*, *COI* e *16S* e nucleares *18S* e *28S* de maneira individual e concatenadas de 25 espécies pertencentes à subordem Heteroptera, sendo 12 espécies da família Coreidae e 13 da Pentatomidae. As sequências geradas referem-se a duas réplicas com sequências *forward* e *reverse* para cada espécie. Os tamanhos dos fragmentos obtidos, assim como as concatenações, estão descritos na Tabela 3.

### Melhor modelo de substituição nucleotídica

O melhor modelo escolhido para todas as sequências dos cinco genes, em estudo, tanto individuais como concatenados foram para o gene *Cyt b*, o *TVM +I+G* (*transversion model*), para os genes *COI*, *28S* e *18S+28S*, o *TrN +I+G* (*Tamura-Nei*), para os genes *16S* e *18S*, o *TIM2+G* (*transition model*) e para os genes *mtDNA* e *mtDNA+rDNA*, o *GTR* (*general time reversible*) (Tabela 3).

### Análises de Parcimônia e Máxima Verossimilhança

Os resultados obtidos por meio do método de Parcimônia quanto ao número de passos (L), índice de consistência (Ci) e índice de retenção (Ri) estão demonstrados na Tabela 4. Observamos que número de passos foram proporcionais aos números de pares de bases e tanto os índices de consistência como de retenção foram maiores nas análises envolvendo os genes nucleares.

Analisando todas as filogenias (Figuras 1 a 8) observamos que as famílias Coreidae e Pentatomidae formam um grupo-irmão nas análises de Parcimônia (P) e Máxima Verossimilhança (MV), com 100% de *bootstrap* em todas as filogenias utilizando o método



de Parcimônia (Figuras 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a), com exceção do gene *COI* com 64% (Figura 2a). No método de Máxima Verossimilhança, apesar das famílias Coreidae e Pentatomidae apresentarem-se como grupo-irmão, todas as filogenias tiveram *bootstrap* abaixo de 50%, não sendo demonstrados nas árvores (Figuras 2b, 3b, 4b, 5b, 7b, 8b). Nas análises do gene *Cyt b*, pelos métodos de Parcimônia e Máxima Verossimilhança (Figura 1a,b) e 28S, pelo método de Máxima Verossimilhança (Figura 6b) as famílias não estão como grupo-irmão.

Os táxons pertencentes à família Coreidae, analisados para a região gênica *Cyt b* pelas duas metodologias (Figura 1a,b) apresentaram-se parafiléticos, enquanto que os táxons pertencentes à família Pentatomidae formaram um único agrupamento com *bootstrap* de 75% na análise de P e 60% na análise de MV (Figura 1a,b). Observamos, ainda, que a espécie *Anisoscelis foliacea* (Coreidae) agrupou com *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae) nos dois métodos utilizados (P e MV) com valores de *bootstrap* de 100% e 99%, respectivamente (Figura 1a,b). Tanto na família Coreidae como na Pentatomidae os agrupamentos foram parafiléticos, na análise de Máxima Verossimilhança para o gene 28S (Figura 6b).

### Família Coreidae

Levando em consideração somente as tribos da família Coreidae (Anisoscelidini, Acanthocerini, Chariesterini, Coreini e Leptoscelini) não observamos a formação de clados entre as espécies pertencentes a cada tribo (Figuras 1 a 8).

Analisando as relações entre as espécies da tribo Anisoscelidini (*A. foliacea*, *Leptoglossus gonagra* e *L. zonatus*) não observamos nenhum padrão de agrupamento nas análises. Por exemplo, a espécie *A. foliacea*, pertencente a família Coreidae na análise do gene *Cyt b*, agrupou-se com *A. tripterus* pertencente à outra família (Pentatomidae: Discocephalini) (Figura 1a,b).

A espécie *A. foliacea* também apareceu mais externamente ao agrupamento das espécies da família Coreidae nas análises do gene *COI* (P) (Figura 2a), nas análises concatenadas dos genes mitocondriais (MV) (Figura 4b), nucleares (MV) (Figura 7a) e com os genes mitocondriais e nucleares (MV) (Figura 8b). *A. foliacea* (Anisoscelidini) também apareceu agrupada com *Anasa bellator* pertencente à tribo Coreini (Coreidae) nas análises dos genes *16S* (Figura 3a,b), *28S* (P) (Figura 6a), nas análises de Parcimônia dos genes concatenados mitocondriais (Figura 4a), nucleares (Figura 7a) e de todos os genes (Figura 8a). Outro agrupamento observado foi entre *A. foliacea* e *Athaumastus haematicus* pertencente a tribo Acanthocerini (Coreidae) para as análises do gene *18S* (Figura 5a,b).

Com relação às espécies do gênero *Leptoglossus* (*L. gonagra* e *L. zonatus*), também, pertencentes à tribo Anisoscelidini das 16 análises realizadas foi observado o agrupamento entre essas espécies somente nas análises referentes ao gene 28S (Figura 6a,b) e nas análises com os genes nucleares concatenados (18S e 28S) (Figura 7a,b), sendo que nesta última análise os valores de *bootstrap* foram maiores (91 e 58%, respectivamente) do que nas análises utilizando somente o gene 28S.

Quando essas espécies não estão agrupadas elas não seguem um padrão de agrupamento. Para as análises do gene *Cyt b* sendo que *L. gonagra* pode estar agrupada, por exemplo, com *Chariesterus armatus* (Chariesterini) (Figura 1a) ou com *Sphictyrtus fasciatus* (Coreini) (Figura 1b). Mas pela análise do gene 18S com a metodologia de Parcimônia foi observado, ainda, o agrupamento com *Dallacoris pictus* (Leptoscelini) na (Figura 5a).

*L. zonatus* pode estar agrupado com *Hypselonotus fulvus* (Coreini) (Figura 1a,b) nas análise do gene *Cyt b* (Parcimônia e Máxima Verossimilhança) com valores de *bootstrap* 100 e 99%, respectivamente, e nas análises concatenadas dos genes mitocondriais (P) (Figura 4a) e na análise com todos os genes (MV) (Figura 8b). Esta espécie também aparece agrupada com *S. fasciatus* (Coreini) na análise do gene 16S (P) (Figura 3a).

Observamos ainda, que *L. gonagra* aparece externamente ao agrupamento formado entre as espécies de *Dallacoris* nas análises utilizando as regiões gênicas dos genes *COI*, 16S (P e MV) e 18S (MV), dos genes mitocondriais (P) e de todos os genes concatenados (P e MV) (Figuras 2a,b, 3a,b, 5b, 4a e 8a,b). Das oito topologias analisadas, em quatro *L. zonatus* está externamente a esse agrupamento (*COI*, P e MV; 18S, MV e mtDNA+DNA, MV) (Figuras 2a,b, 5b e 8b, respectivamente).

Uma outra análise realizada levou em consideração as espécies da tribo Coreini (*A. bellator*, *Catorhintha guttula*, *H. fulvus*, *S. fasciatus*, *Zicca annulata*). Nesta tribo observamos que *C. guttula*, *H. fulvus* e *S. fasciatus* agruparam-se nas análises do gene *COI* (P e MV) (Figura 2a,b), dos genes mitocondriais concatenados (MV) (Figura 4b) e com todos os genes concatenados (P) (Figura 8a). Nesta tribo foram observados agrupamentos entre *C. guttula*, *H. fulvus* e *Z. annulata* na análise do gene 16S (MV) (Figura 3b); entre *C. guttula* e *H. fulvus* na análise do gene 16S (P) (Figura 3a); entre *C. guttula* e *S. fasciatus* com todos os genes concatenados (MV) (Figura 8b) e entre *S. fasciatus* e *Z. annulata* na análise do genes 18S (P) (Figura 5a).

Na tribo Leptocelini (Coreidae) na qual foi analisado somente o gênero *Dallacoris* (*D. pictus* e *D. obscura*) observamos que os agrupamentos foram consistentes com valores de *bootstrap* maiores de 50% em 75% das análises, sendo que em 56% destas análises

o *bootstrap* foi de 100% (Figuras 1a, 2a,b, 3a,b, 4a,b, 8a,b). Em duas filogenias (18S e 28S, Parcimônia) (Figuras 5a e 6a), as espécies de *Dallacoris* não se agruparam entre si e estão externamente às espécies de *Leptoglossus*.

Com relação às tribos Acanthocerini e Chariesterini, pertencentes à família Coreidae, no presente trabalho, só utilizamos um representante de cada tribo, a espécie *A. haematicus* (Acanthocerini) e *C. armatus* (Chariesterini). Essas espécies não apresentaram nenhum padrão de agrupamento.

### Família Pentatomidae

Nas análises das espécies das tribos da família Pentatomidae (Discocephalini, Edessini, Carpocorini, Chlorocorini, Pentatomini e Piezodorini) observamos que na tribo Discocephalini (*A. tripterus* e *Platycarenum umbraculatus*) as espécies estão agrupadas nas análises do gene 28S (P e MV) (Figura 6a,b), nas análises concatenadas dos genes mitocondriais (MV) (Figura 4b), nucleares (P e MV) (Figura 7a,b) e com todos os genes (P) (Figura 8a), sendo que nas análises do gene 28S e dos genes nucleares concatenados os valores de *bootstrap* foram superiores a 75% (Figuras 6a,b e 7a,b).

As espécies da tribo Carpocorini (*Dichelops melacanthus*, *Euschistus heros*, *Mormidae v-luteum*, *Oebalus poecilus* e *Oebalus ypsilon*) estão todas agrupadas na análise do gene 18S (P) (Figura 5a), porém, o *bootstrap* foi inferior a 50%. Na análise do gene *Cyt b* (P) as espécies também estão agrupadas, porém, a espécie *Loxa deducta* pertencente à tribo Chlorocorini (Pentatomidae) está agrupada com a espécie *D. melacanthus* (Figura 1a) e na análise do gene *COI* (P) a espécie *Proxys albopunctulatus* (Pentatomini) está no agrupamento da tribo Carpocorini (Figura 2a).

Em 11 análises as espécies *E. heros*, *M. v-luteum*, *O. poecilus* e *O. ypsilon* estão agrupadas (Figuras 3a,b, 4a,b, 5b, 6a,b, 7a,b e 8a,b), sendo que *D. melacanthus* sempre está externamente a esse agrupamento, e em seis análises agrupado com *L. deducta* (Chlorocorini). Na análise do gene *COI* (MV) as espécies de *Oebalus* estão fora do agrupamento entre as espécies da tribo Carpocorini (Figura 2b).

As espécies *O. ypsilon* e *O. poecilus* agruparam-se em 14 das 16 análises, sendo que em 64% destas, os valores de *bootstrap* são superiores a 95% (Figuras 3a,b, 4a,b, 6b, 7a,b e 8a,b). Não houve agrupamento destas espécies, somente, nas análises do gene *Cyt b* (Figura 1a,b), sendo que na análise de Parcimônia *O. ypsilon* está agrupado

com *E. heros* e de MV com *M. v-luteum* e, em ambos os casos, *O. poecilus* está externo ao agrupamento. Os *bootstrap* desses agrupamentos não foram significativos (Figura 1a,b).

As espécies da tribo Chlorocorini (*Chlorocoris complanatus* e *Loxa deducta*) não estão agrupadas em nenhuma das análises, não apresentando nenhum padrão de agrupamento. *L. deducta*, por exemplo, está agrupada com *D. melacanthus* (Carpocorini) em sete topologias (Figuras 1a, 3a,b, 4a,b e 8a,b), e em duas com *E. meditabunda* (Edessini) (Figura 5a,b), *Thyanta perditor* (Pentatomini) (Figura 2a,b) ou com *Piezodorus guildinii* (Piezodorini) (Figuras 6b e 7b).

A tribo Pentatomini tem como representantes, no presente estudo, as espécies *P. albopunctulatus* e *T. perditor* as quais se apresentaram agrupadas uma única vez na análise do gene *18S* (MV), sem *bootstrap* significativo (Figura 5b). Observamos que a espécie *P. albopunctulatus* está em nove filogenias agrupada com a espécie *P. guildinii* (Piezodorini-Pentatomidade) (Figuras 1ab, 2b, 3ab, 4ab e 8ab) sendo que oito destas análises tem *bootstrap* superiores a 50%. Estas análises referem-se aos genes *Cyt b* (Figura 1ab), *16S* (Figura 3a,b) e nas análises concatenadas dos genes mitocondriais (Figura 4ab) e com todos os genes concatenados (Figura 8a,b). Nas demais análises as espécies da tribo Pentatomini não apresentaram nenhum padrão de associação.

As tribos Edessini e Piezodorini possuem, no presente trabalho, um único representante de cada, *E. meditabunda* e *P. guildinii*, respectivamente, e não apresentaram nenhum padrão de agrupamento, com exceção das análises em que *P. guildinii* está agrupado com *P. albopunctulatus* (Pentatomini) (Figuras 1ab, 2b, 3ab, 4ab, 8ab).

## DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a fim de analisar suas relações filogenéticas utilizando as metodologias de Parcimônia e Máxima Verossimilhança baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*18S* e *28S*) de maneira individual ou concatenada.

Os resultados mostraram que na maioria das análises a família Coreidae formou um agrupamento monofilético. No presente trabalho analisamos uma única subfamília, Coreinae, e cinco tribos (Anisoscelidini, Acanthocerini, Chariesterini, Coreini e Leptocelini). As tribos, normalmente, não formam clado, com exceção da tribo Leptocelini em que as espécies são congênicas, isso pode ser atribuído pelo baixo número de

representantes. Na literatura há um único trabalho que analisa a família Coreidae e suas relações intrafamiliares. Esse trabalho demonstra que Coreidae e sua subfamília Coreinae, assim como suas tribos, com exceção de Chariesterini é um bom grupo monofilético (LI et al., 1996).

Quanto à família Pentatomidae foram utilizadas três subfamílias (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) e seis tribos (Discocephalini, Edessini, Carpocorini, Chlorocorini, Pentatomini e Piezodorini) e, em todas as análises foi observada a monofilia do grupo. Esta condição também foi demonstrada em outros estudos, com as subfamílias Asopinae e Discocephalinae, apesar de não resolverem suas relações intrafamiliares (GAPUD, 1991; HASAN; KITVHING, 1993; GRAZIA et al., 2008).

No presente trabalho analisamos uma única família de cada superfamília (Coreidae - Coreoidea; Pentatomidae - Pentatomoidea) e na maioria das análises houve formação de grupo-irmão, mas para confirmação da monofilia há necessidade da análise de um maior número de táxons.

Segundo a literatura, com relação às superfamílias, as relações ainda não são bem estabelecidas sendo que apenas Pentatomoidea é considerada monofilética, por todos os autores (SCHUH, 1979; WHEELER et al., 1993; HENRY, 1997; LI et al., 1996; 2005; HUA et al., 2008; WEIRAUCH; SCHUH, 2011; YAO et al., 2012).

Nos estudos referentes à superfamília Coreoidea ainda há controvérsias sobre seu agrupamento. A maioria dos estudos reconhece o grupo como monofilético (LI et al., 1996; HENRY, 1997; HUA et al., 2008; YAO et al., 2012), porém há estudos que não suportam essa hipótese (LI et al., 2005; XIE et al., 2005). Com relação à monofilia de Heteroptera e da infraordem Pentatomomorpha é bem aceita e documentada entre os estudos existentes.

Com relação aos métodos de análises moleculares, há muitos descritos na literatura. No presente trabalho, por exemplo, utilizamos Parcimônia e Máxima Verossimilhança e nas observações houve uma grande semelhança entre os métodos utilizados e as análises mais robustas se mostraram quando os genes foram concatenados.

Observamos o agrupamento constante de espécies da mesma tribo nas análises utilizando os genes *Cyt b*, *COI*, *16S*, *18S* e *28S* como, por exemplo, entre *M. v-luteum*, *E. heros* e *Oebalus* sp. (Carpocorini-Pentatomidae) e entre as espécies *A. tripterus* e *P. umbraculatus* da tribo Discocephalini (Pentatomidae). Além das espécies do mesmo gênero, *Dallacoris* (Coreidae) e *Oebalus* (Pentatomidae), que se agruparam na maioria das análises.

Porém, os agrupamentos entre tribos diferentes foram constantemente observados entre as espécies da família Coreidae, como por exemplo, *A. bellator* (Coreini) e *A. foliacea* (Anisoscelidini) e as relações entre as espécies de *Dallacoris* (Leptoscelini) e *Leptoglossus* (Anisoscelidini). Sendo que nesta última, ou as espécies de *Leptoglossus* estão externas ao agrupamento de *Dallacoris* ou, as espécies de *Dallacoris* não estão agrupadas e estão externas ao agrupamento entre as espécies de *Leptoglossus*. Essas relações devem ser melhor estudadas, mesmo porque já foram evidenciadas no estudo de Souza (2013).

Alguns agrupamentos entre tribos diferentes como *P. albopunctulatus* (Pentatomini) e *P. guildinii* (Piezodorini) (Pentatomidae), *D. melacanthus* (Carpocorini) e *L. deducta* (Chlorocorini) (Pentatomidae) foram confirmados, com diferentes métodos (Parcimônia e Máxima Verossimilhança), e devem ser mais explorados com novas análises.

A partir das análises foi possível identificar algumas relações entre as famílias, tribos e gêneros, demonstrando a eficiência dos genes e metodologias escolhidas. As análises filogenéticas utilizando estas metodologias com os genes do presente estudo e as espécies utilizadas são inéditas, e com certeza auxiliarão no esclarecimento de possíveis dúvidas que possam aparecer nos estudos com este grupo.

No entanto, novos estudos deverão ser realizados para que se confirmem os agrupamentos robustos e se resolvam ou entenda as inconsistências, pois, devido a escassez de dados sobre estas famílias os agrupamentos devem ser confirmados, pois, só assim poderemos identificar o por quê das inconsistências e futuramente obter relações robustas.

## AGRADECIMENTOS

Professores Doutores Jocélia Grazia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Luiz Antônio Alves Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro-Museu Nacional) pela identificação das espécies. Ao CNPq e a FAPESP pelos auxílios financeiros.

## REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An Acad Bras Ciênc**, v. 77, p. 437-454, 2005.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINUTOSGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Rev Ecol Syst**, v.18, p. 489-522, 1987.

- BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on *18S* rDNA sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v.14, p. 569–577, 1997.
- BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T.; FAHEY, G. T.; FONTENILLE, D.; BRAACK, L. E.; HAWLEY, W. A.; COLLINS, F. H. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. **Genetics** , v. 147, p. 1817-1828, 1997.
- COCCIOLONE, S. M.; CONE, K. C. P1-Bp an anthogonin regulatory gene of maize that leads, to variegated pigmentation. **Genetics**, v. 135, p. 575-588, 1993.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003
- CRYAN; J.R; URBAN, J.M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? **Syst Entomo**, v. 37, p. 7-21, 2012
- 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. **Mol Marine Biol and Biotech**, v. 3, p. 294-299, 1994.
- GAPUD, V.P. A generic revision of the subfamily Asopinae, with consideration on its phylogenetic position in the family Pentatomidae and superfamily Pentatomoidea (Hemiptera-Heteroptera). **Philip Entomol.** v. 8, p. 865-961, 1991.
- GARCIA, B.A.; POWELL, J.R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **J Med Entomol**, v. 35, p. 232-238,1998.
- GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S.; HAN, H. Y.; McPERON, B. A.; STECK, G. J. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. **Insect Mol Biol**, v.4, p. 61-67, 1995.
- GRAZIA, J.; FORTES, N.D.F.; CAMPOS, L.A. Pentatomoidea. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**,5: invertebrados terrestres. p.101-112. São Paulo: FAPESP, 1999.
- GRAZIA, J.; SCHUH, R.T.; WHEELER, W.C. Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). **Cladistics**, v. 24, p. 932-976, 2008.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. **T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology**. Program and documentation, available, 2003.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p.307-321, 2010.

- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, 1999.
- HASAN, S.A.; KITCHING, I.J. A cladistic analysis of the tribes of the Pentatomidae (Heteroptera). **Japan Jour Entomol.** v. 61, p. 651-669, 1993.
- HENRY, T.J. Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera, Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 90, p. 275-301, 1997.
- 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.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics,** v. 5, p. 150 –163, 2004.
- LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; BESANSKY, N. J.; ESCALANTE, A. A.; COLLINS, F. H.; HAWLEY, W. A. The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya: the mtDNA perspective. **J. Heredity.** v. 91, p. 165-168, 2000.
- LI, H.; DENG, R.; WANG, J.; CHEN, Z.; JIA, F.; WANG, X. A preliminary of the Pentatomomorpha (Hemiptera:Heteroptera) based on the nuclear *18S* rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Mol Phyl Evol,** v. 37, p. 313-326, 2005.
- LI, X.Z. Cladistic analysis and higher classification of Coreoidea (Heteroptera). **Entomol Sinaca.** v. 3, p. 283-292, 1996.
- 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.
- MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am J of Trop Med and Hyg,** v. 62, p. 460-65, 2000.
- MURAJI, M.; TACHIKAWA, S. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. **Entomol Sci,** v. 3, p. 615-626, 2000.
- NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA . Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the *Triatominae* *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali* . **Med and Vet Entomol.** v. 20, n. 4, p. 353–357, 2006.
- NIXON, K. C. **WinClada ver. 1.00.08** Published by the author, Ithaca, NY. Available at [http://www.cladistics.com/about\\_winc.htm](http://www.cladistics.com/about_winc.htm), 2002.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Mol Bio and Evol,** v.25, p. 1253-1256, 2008.



- RAMBAUT, A. **FigTree v1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2010.
- SCHAEFER, W. C. The Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera): an annotated outline of its systematic history. **Eur. J. Entomol.** v. 90, p. 105–122, 1993.
- SCHAEFER, C.W.; PANIZZI, A.R. **Economic Importance of Heteroptera: A General View**. CRC press, Nature, 2000.
- SCHUH, T.T.; SLATER, J.A. **True bugs of the world (Hemiptera:Heteroptera) Classification and natural history**. Cornell UNIVERSITY press, Ithaca, New York, xii, 338pp, 1995.
- SCHUH, R.T. [Review of] Evolutionary Trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and Feeding Strategies, by R. H. Cobben **Syst Zool**, v. 28, p. 653–659, 1979.
- SCOTT, M.; DARRYL, L. *Sequence Analysis*. **Beijing: O'Reilly**, 286 p. ISBN 0-596-00494-X (blast), 2003.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECHENBACH, A.; CRESPI, B. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.87, p. 651-701, 1994.
- SOUZA, H. V. **Relacionamento Filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes COI, 16S e 18S**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2013. p.38-93. Tese, Programa de Pós Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2013.
- SWEET, M.H. **The Comparative External Morphology of the Pregenital Abdomen of Hemiptera**. In *Studies on Hemipteran Phylogeny*. Edited by Schaefer CW. Proceedings, Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, Lanham, MD;p. 119-158, 1996.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitive of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. 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 relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. **Entomol Scand** , v. 24, p. 121-137, 1993.
- XIE Q.; BU W.; ZHENG, L. The Bayesian phylogenetic analysis of the *18S* rRNA sequences from the main lineages of Trichophora (Insecta: Heteroptera: Pentatomomorpha). **Mol Phylogenet Evol** , v. 34, p. 448-451, 2005.

XIONG, B.; KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). **Genome**. v. 34, p. 306-311, 1991.

ZHANG, D.X.; SZYMURA, J.M.; HEWITT, G.M. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.** v. 40, p. 382-391, 1995.

YAO, Y.; REN, D.; RIDER, D.A.; CAI, W. Phylogeny of the Infraorder Pentatomomorpha based on Fossil and Extant Morphology, with description of the new Fossil Family from China. **PloS ONE**, v.7, n. 5, 2012.

Tabela 1. Famílias, Subfamílias, Tribos e Espécies utilizadas de Heteroptera no presente estudo, com os respectivos números de acessos para as sequências do genes *COI*, *16S*, *18S* e *28S*.

Família	Subfamília	Tribo	Espécies	Número de acesso						
				COI		16S	18S	28S		
				Região 1	Região 2					
<b>Coreidae</b>	Coreinae	<b>Anisoscelidini</b>	<i>Anisoscelis foliacea</i>	JQ037895	JQ218470	KC537034	KC537009	KC796318		
			<i>Leptoglossus gonagra</i>	JQ037902	JQ218477	KC537041	KC537016	KC796320		
			<i>Leptoglossus zonatus</i>	JQ037903	JQ218478	KC537042	KC537017	KC796321		
		<b>Acanthocerini</b>	<i>Athaumastus haematicus</i>	JQ037896	JQ218471	KC537035	KC537010	KC796322		
			<b>Chariesterini</b>	<i>Chariesterus armatus</i>	JQ037898	JQ218473	KC537037	KC537012	KC796324	
		<b>Coreini</b>	<i>Anasa bellator</i>	JQ031214	JQ218469	KC537033	KC537008	KC796325		
			<i>Catorhintha guttula</i>	JQ037897	JQ218472	KC537036	KC537011	KC796326		
			<i>Hypselonotus fulvus</i>	JQ037901	JQ218476	KC537040	KC537015	KC796328		
			<i>Sphictyrtus fasciatus</i>	JQ037904	JQ218479	KC537043	KC537018	KC796329		
			<i>Zicca annulata</i>	JQ037905	JQ218480	KC537044	KC537019	KC796331		
		<b>Leptoscelini</b>	<i>Dallacoris obscura</i>	JQ037899	JQ218474	KC537038	KC537013	KC796332		
			<i>Dallacoris pictus</i>	JQ037900	JQ218475	KC537039	KC537014	KC796333		
		<b>Pentatomidae</b>	Discocephalinae	<b>Discocephalini</b>	<i>Antiteuchus tripterus</i>	JQ218456	JQ218481	KC537020	KC537045	KC796334
					<i>Platycarenum umbraculatus</i>	JQ218466	JQ218491	KC537030	KC537055	KC796336
Edessinae	<b>Edessini</b>		<i>Edessa meditabunda</i>	JQ218459	JQ218484	KC537023	KC537048	KC796337		
Pentatominae			<b>Carpocorini</b>	<i>Dichelops melacanthus</i>	JQ218458	JQ218483	KC537022	KC537047	KC796339	
	<i>Euschistus heros</i>			JQ218460	JQ218485	KC537024	KC537049	KC796340		
			<i>Mormidae v-luteum</i>	JQ218462	JQ218487	KC537026	KC537051	KC796342		
			<i>Oebalus poecilus</i>	JQ218463	JQ218488	KC537028	KC537053	KC796345		
			<i>Oebalus ypsilongriseus</i>	JQ218464	JQ218489	KC537027	KC537052	KC796344		
	<b>Chlorocorini</b>		<i>Chlorocoris complanatus</i>	JQ218457	JQ218482	KC537021	KC537046	KC796347		
			<i>Loxa deducta</i>	JQ218461	JQ218486	KC537025	KC537050	KC796348		
	<b>Pentatomini</b>		<i>Proxys albopunctulatus</i>	JQ218467	JQ218492	KC537031	KC537056	KC796349		
			<i>Thyanta perditor</i>	JQ218468	JQ218493	KC537032	KC537057	KC796351		
	<b>Piezodorini</b>		<i>Piezodorus guildinii</i>	JQ218465	JQ218490	KC537029	KC537054	KC796353		

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ampliações de fragmentos de DNA dos genes *Cyt b*, *COI*, *16S*, *28S* e *18S*.

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse	Referência
<i>COI_1</i>	5' TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'	FOLMER et al. (1994)
<i>COI_2</i>	5'AGCAGGAAATTCATCAATTTT 3'	5' CTGTAAATATGTGATGTGCTC3'	FOLMER et al. (1994)
<i>Cyt b</i>	5' GGACAAATATCATTGAGGAGCAACAG 3'	5' ATTACTCCTCTAGCTTATTAGGAATTG 3'	LYMAN et al. (1999)
<i>16S</i>	5' CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT3'	5'CGCCTGTTTAAACAAAAACAT 3'	SIMON et a.l. (1994)
<i>18S</i>	5'AACCTGGTTGATCCTGCCA3'	5'CTGAGATCCAACACTACGAGCTT 3'	BARGUES; MAS-COMA (1997)
<i>28S</i>	5'CCCGTCTTGAACACGGACCAA3'	5'CCACAGCGCCAGTTCTGCTTAC 3'	MURAJI; TACHIKAWA (2000)

Tabela 3. Tamanho das sequências (pares de bases) em análise e o melhor modelo escolhido.

Sequência	Tamanho (pb)	Modelo escolhido	I (p-inv)	G (gama shape)
<i>Cyt b</i>	449	TVM	0,4140	0,3790
<i>COI</i>	1010	TrN	0,1960	0,1570
<i>16S</i>	552	TIM2	-	0,2620
<i>mtDNA (Cyt b, COI e 16S)</i>	2017	GTR	0,3450	0,3880
<i>18S</i>	669	TIM2	-	0,1990
<i>28S</i>	567	TrN	0,3800	0,2620
<i>rDNA (18S e 28S)</i>	1239	TrN	0,5200	0,2760
<i>mtDNA+ rDNA</i>	3259	GTR	0,4440	0,3550

Tabela 4. Resultados obtidos por meio do método de Parcimônia quanto ao número de passos (L), índice de consistência (Ci) e índice de retenção (Ri) referentes às análises das sequências dos genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*18S* e *28S*) de maneira individual e concatenada das 25 espécies pertencentes às famílias Pentatomidae e Coreidae (Heteroptera).

Sequências Gênicas	Número de Passos (L)	Índice de Consistência (Ci)	Índice de Retenção (Ri)
<i>Cyt b</i>	1024	0,37	0,49
<i>COI</i>	2490	0,32	0,35
<i>16S</i>	1188	0,42	0,55
<i>mtDNA (Cyt b, COI e 16S)</i>	3902	0,34	0,40
<i>18S</i>	129	0,92	0,93
<i>28S</i>	306	0,76	0,78
<i>18S + 28S</i>	441	0,80	0,81
<i>mtDNA+ 18S + 28S</i>	5378	0,38	0,43

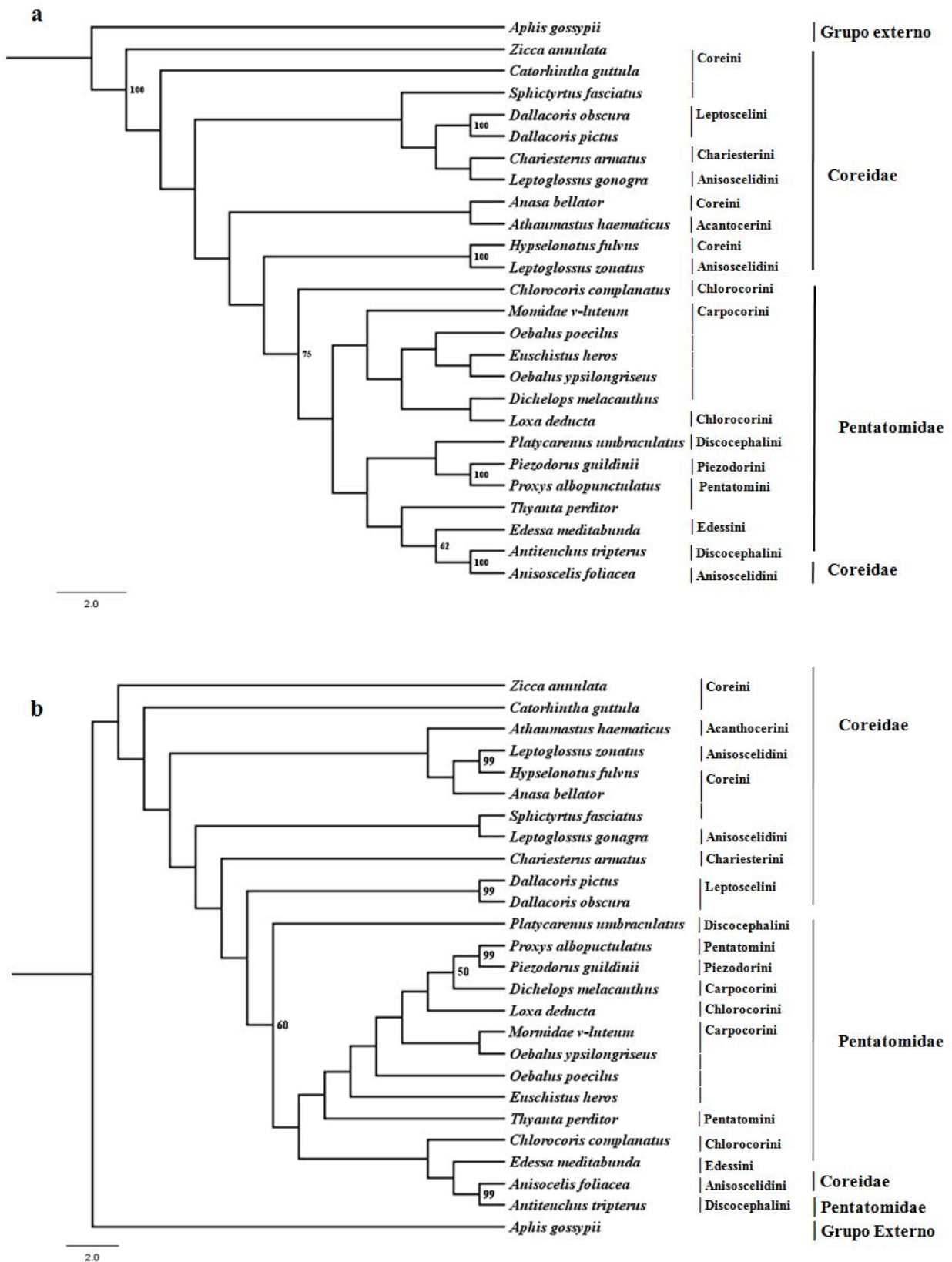


Figura 1. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências do gene mitocondrial *Cyt b* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

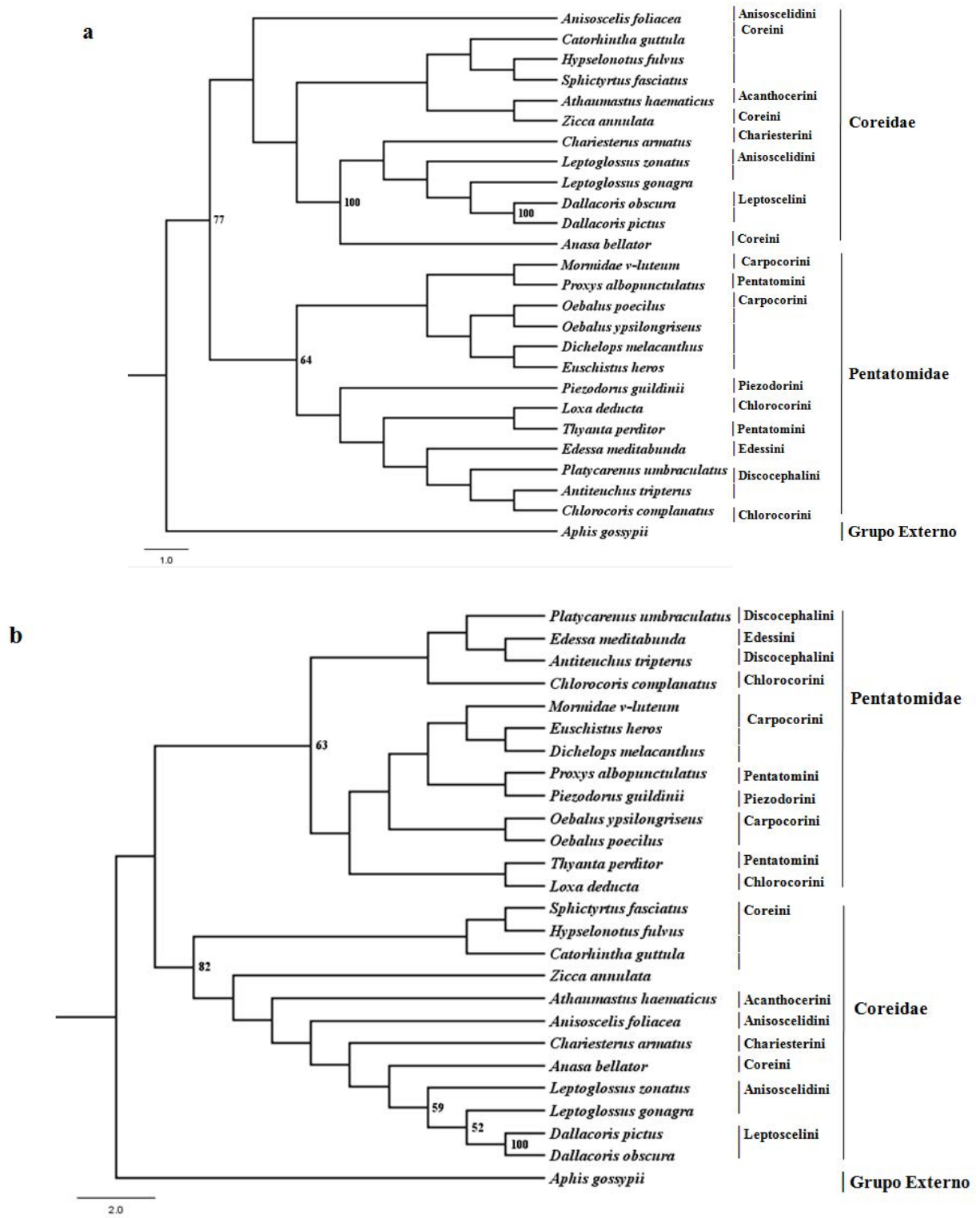


Figura 2. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências do gene mitocondrial *COI* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores de *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

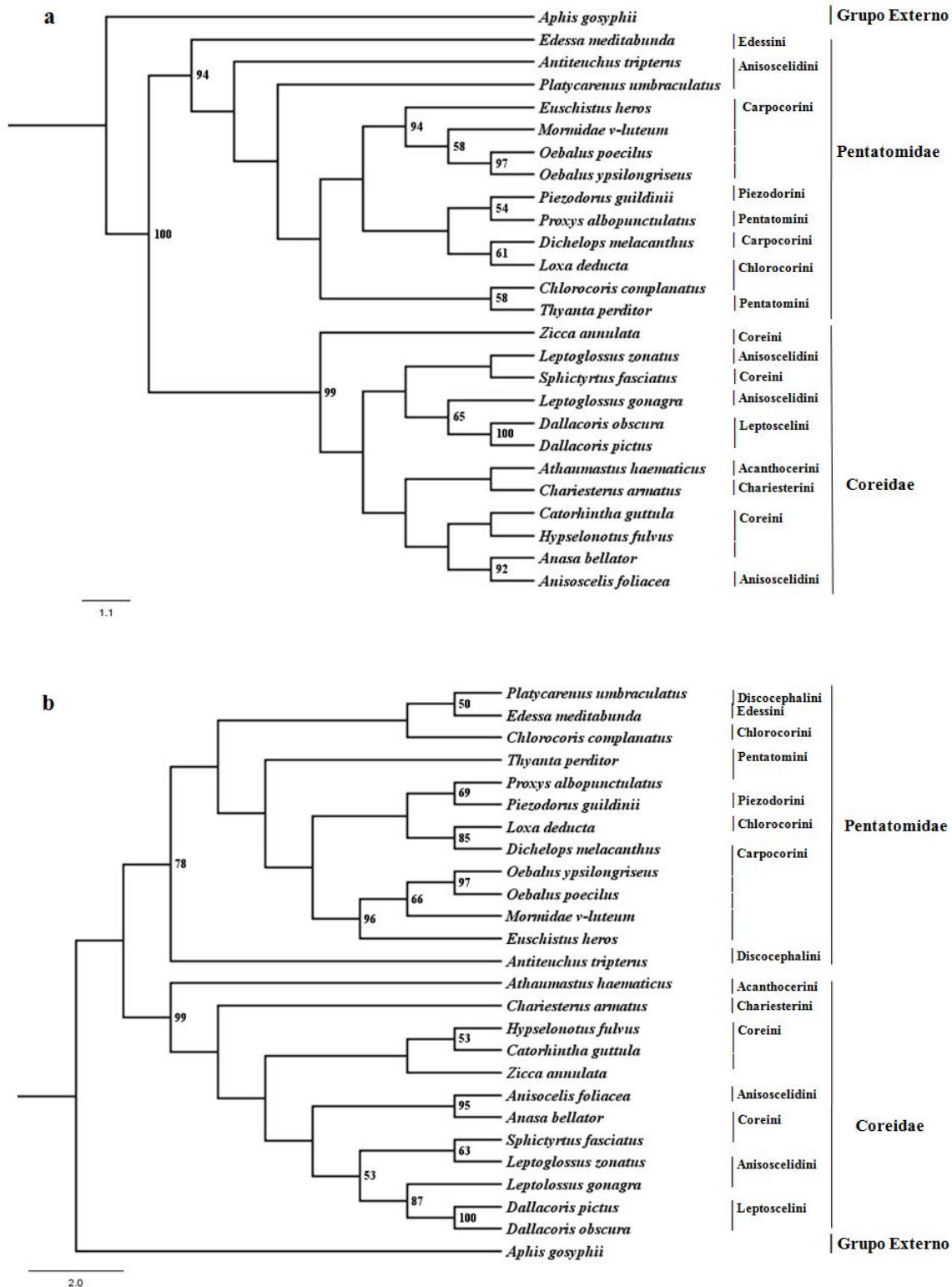


Figura 3. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências do gene mitocondrial *16S* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

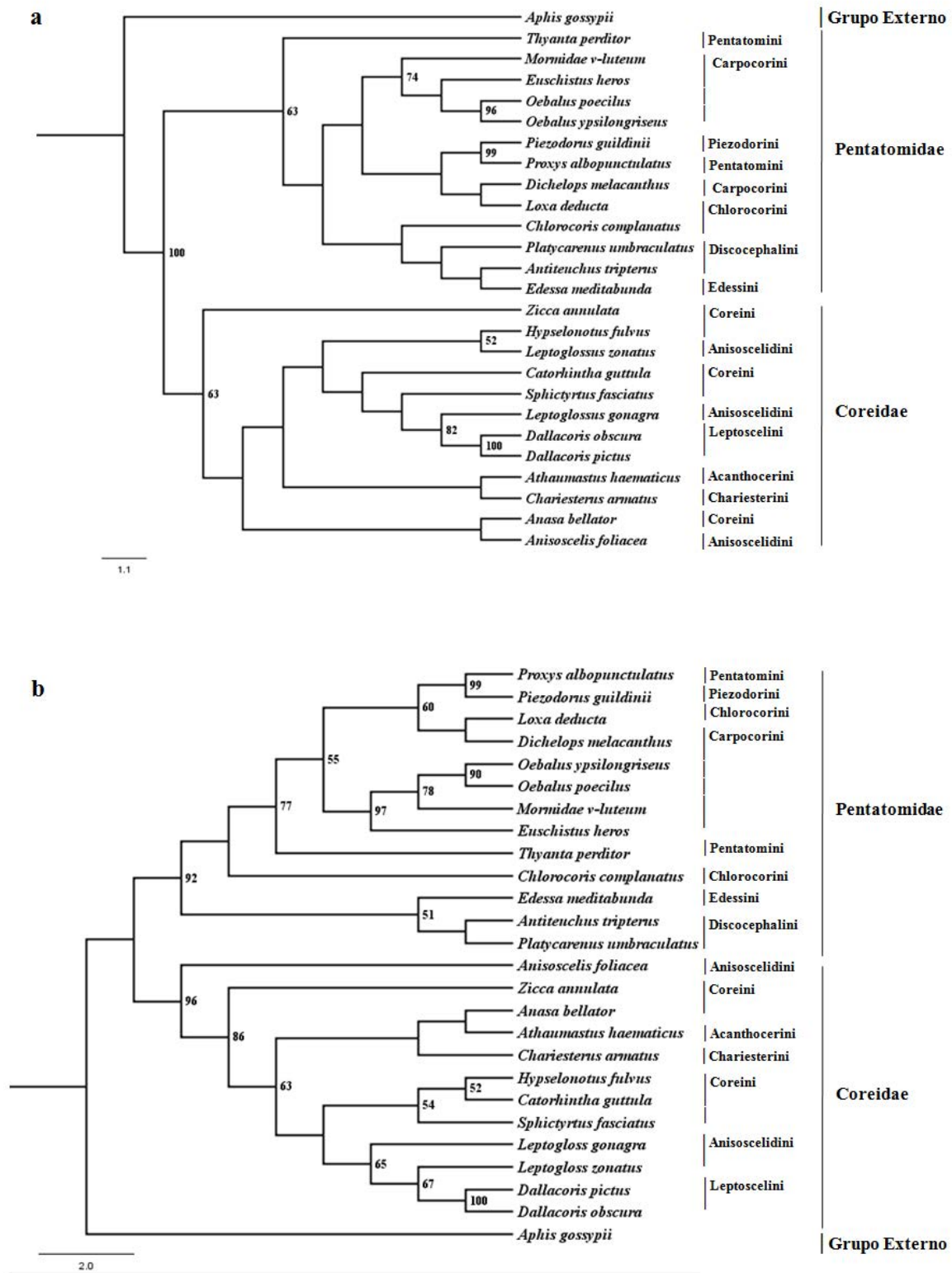


Figura 4. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências concatenadas dos genes mitocondriais *Cyt b*, *COI* e *16S* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.



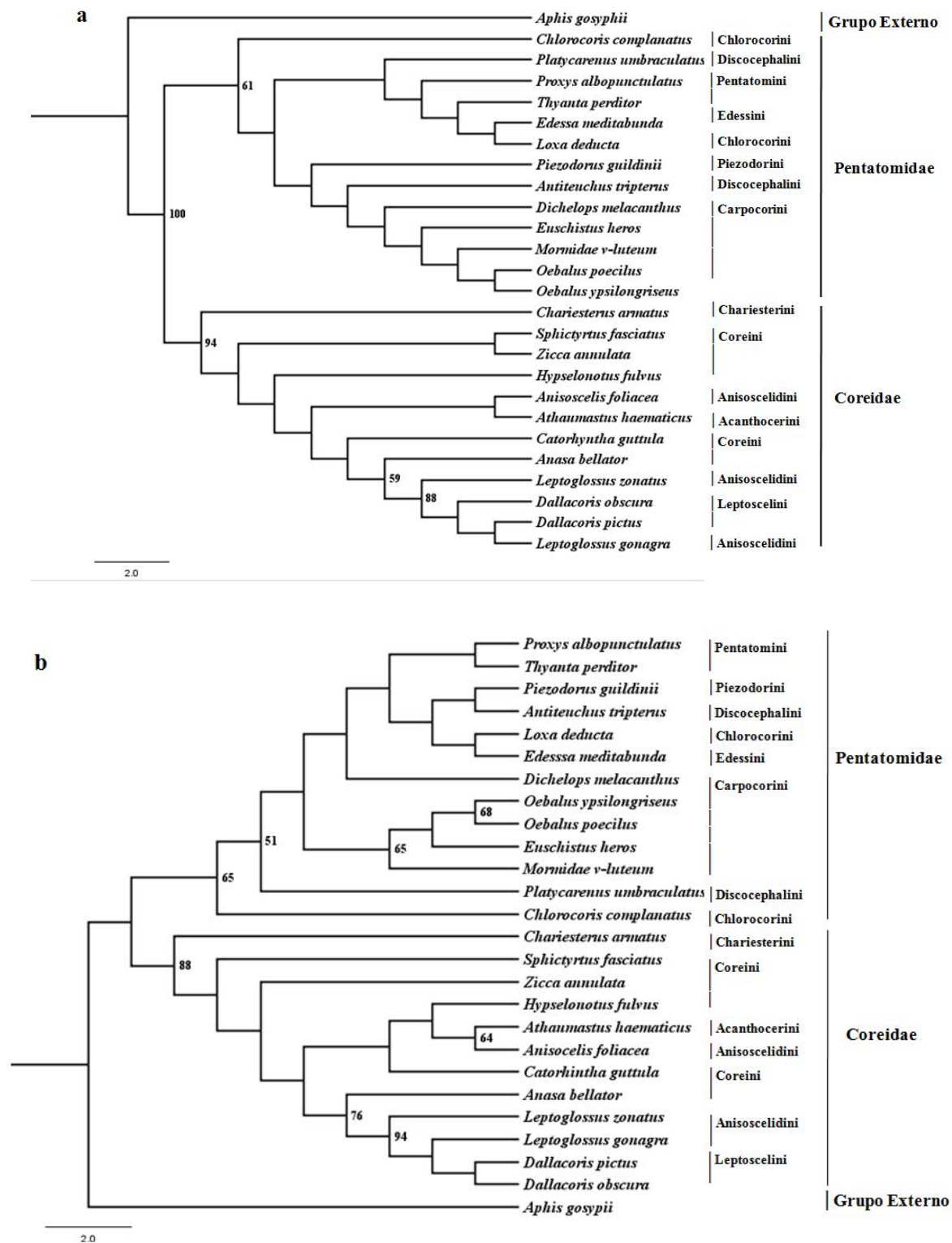


Figura 5. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências do gene nuclear *18S* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

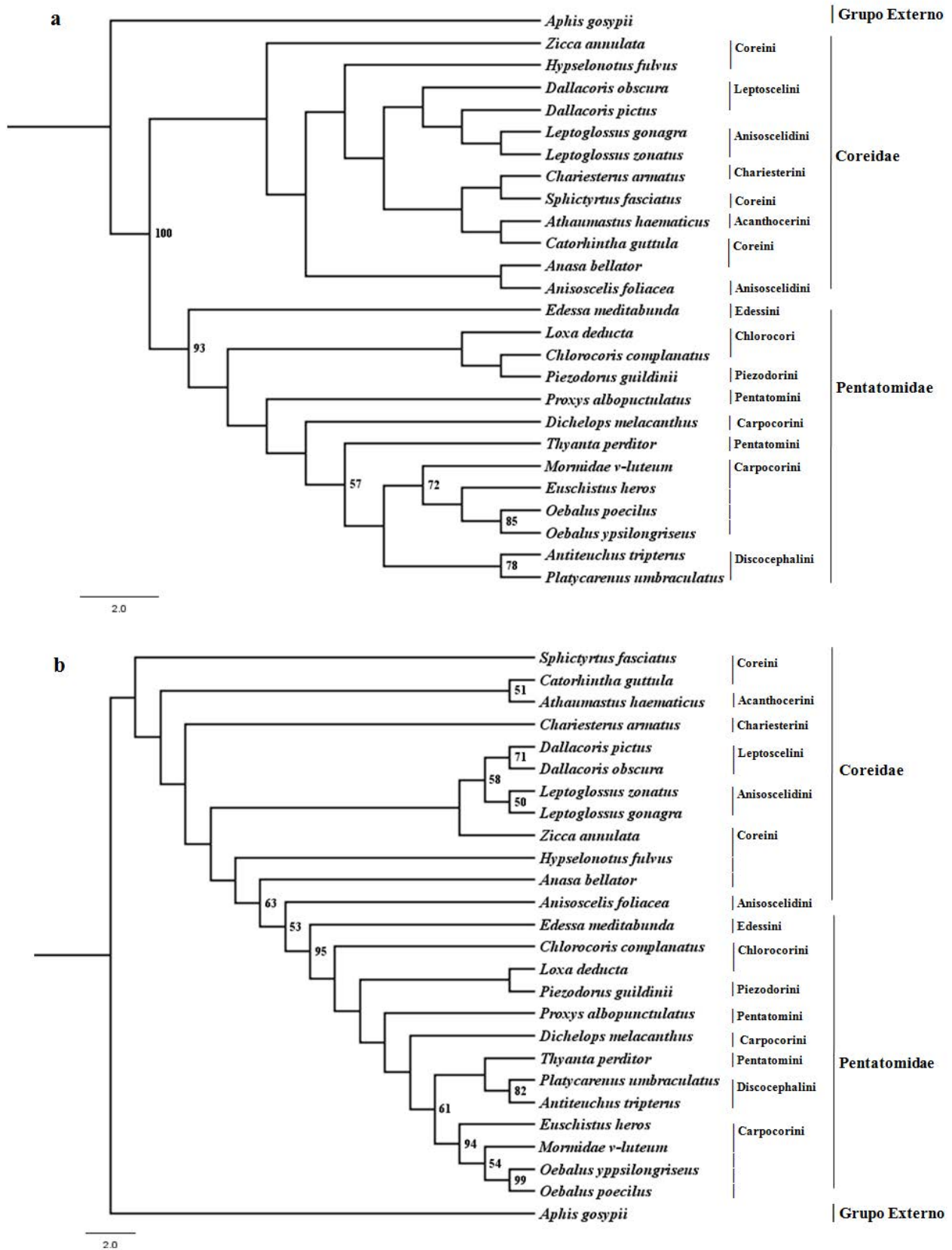


Figura 6. Árvores filogenéticas de acordo com as sequências do gene nuclear 28S de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

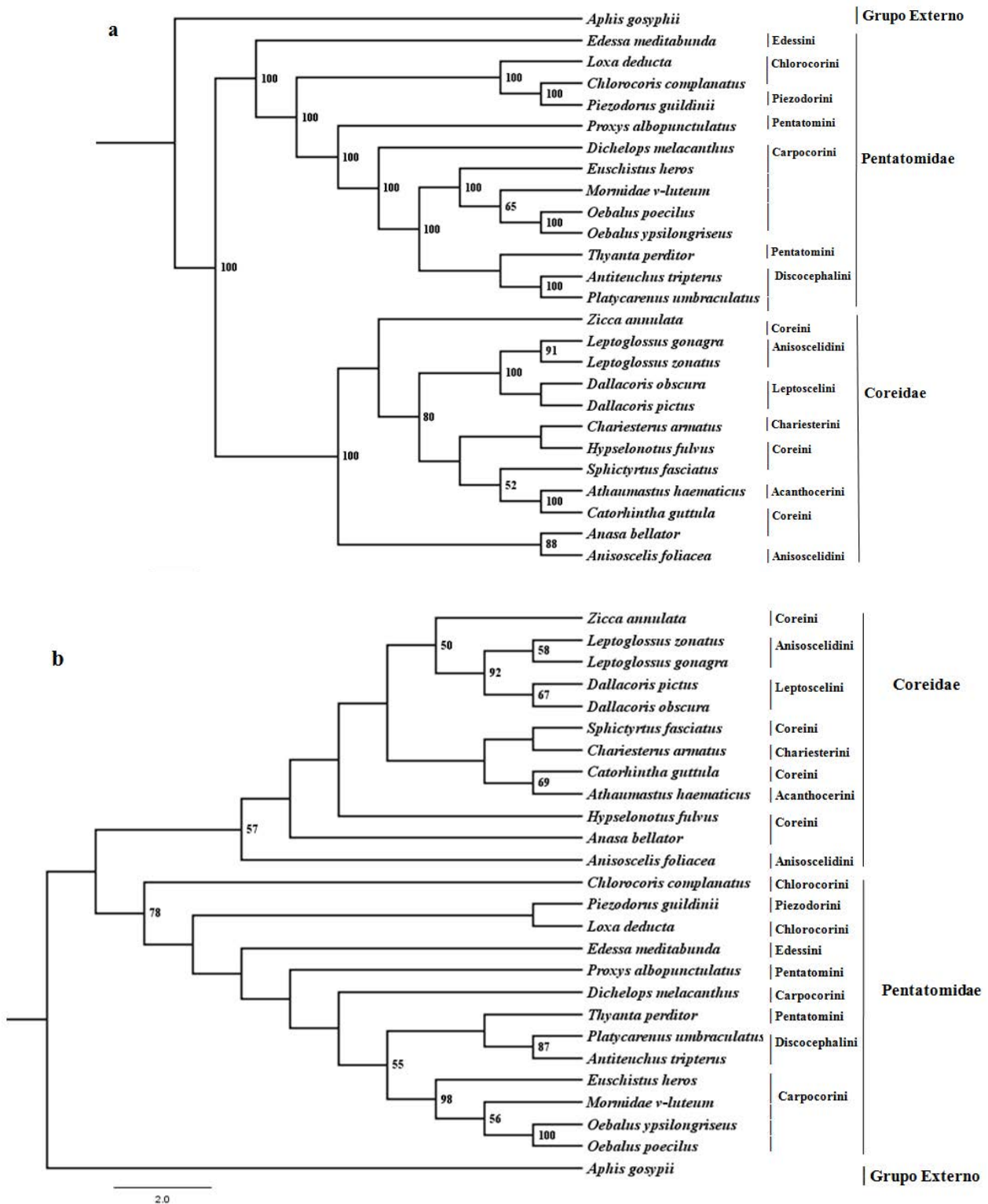


Figura 7. Árvores filogenéticas de acordo com as seqüências concatenadas dos genes nucleares *18S* e *28S* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

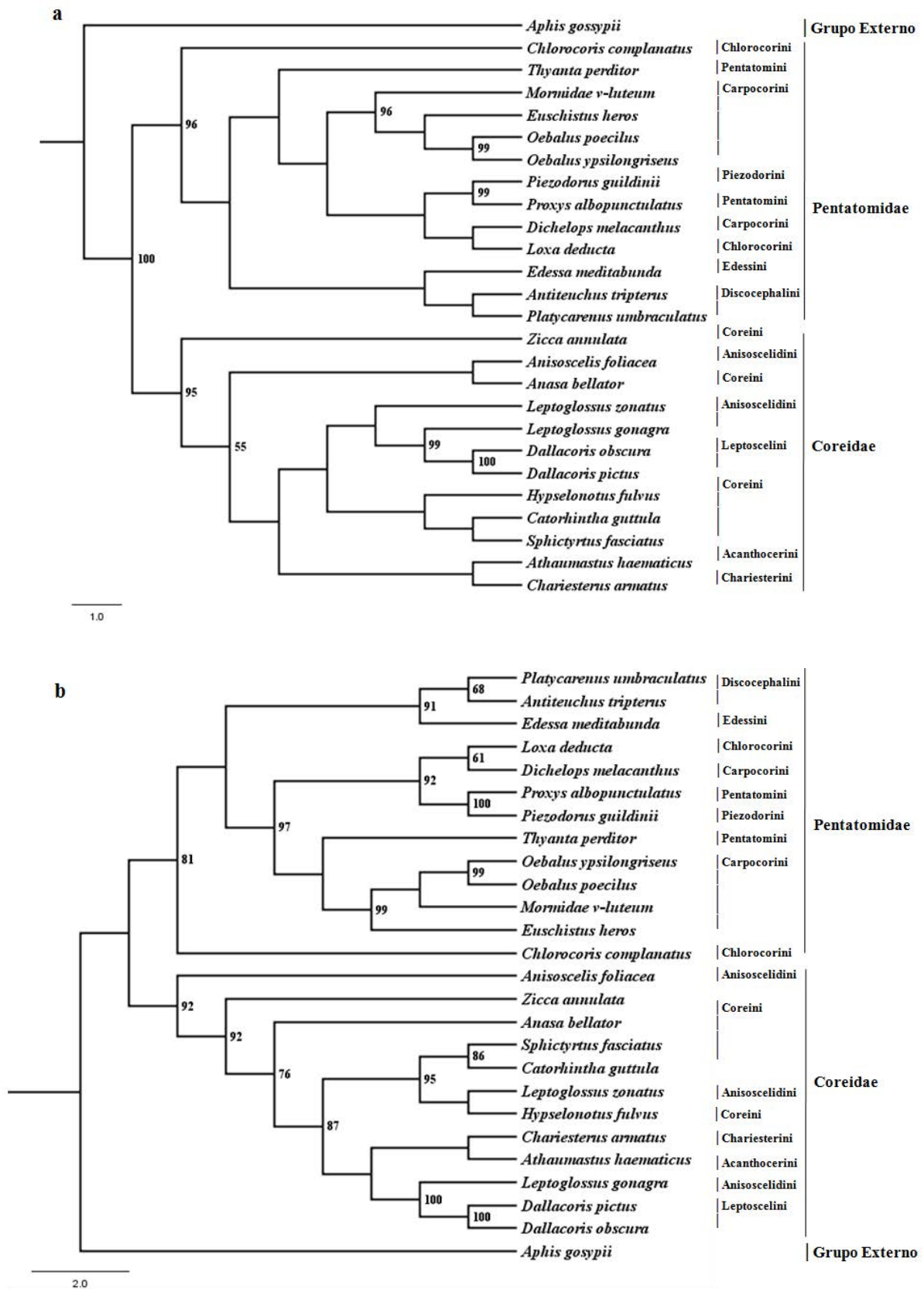


Figura 8. Árvores filogenéticas de acordo com as seqüências concatenadas dos genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI*, *16S*) e nucleares (*18S* e *28S*) de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando os Métodos de: a) Parcimônia (P) e b) Máxima Verossimilhança (MV). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.



## **Filogenias de espécies de Heteroptera baseadas em dados moleculares, morfológicos e citogenéticos**

GOMES, M.O.<sup>1</sup>; CASTANHOLE, M.M.U<sup>1</sup>; SOUZA, H.V.<sup>1</sup>; ITOYAMA, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

[mariana.oliveiragomes@gmail.com](mailto:mariana.oliveiragomes@gmail.com)

Palavras-Chaves: Coreidae, Pentatomidae, morfologia testicular, complemento cromossômico

### **RESUMO**

Os Heteroptera, ou percevejos são os maiores e mais diversificados grupos de insetos com metamorfose incompleta, compreendem cerca de 80 famílias, sendo que, a maioria pode ser encontrada em quase todos os continentes. A maioria das vezes considerados prejudiciais, por serem pragas agrícolas e podendo ser vetores de doenças (Chagas), porém também podem ser úteis como agentes de controle biológico, pois, se alimentam de alguns insetos que destroem várias culturas. Apesar de sua importância, os estudos sobre este grupo ainda é pouco explorado. Como exemplo, podemos citar a investigação da pigmentação da bainha peritoneal que reveste os testículos, o número de lobos que formam os testículos e a presença de um *lobo harlequim*. Citogeneticamente, os Coreidae possuem sistema cromossômico do sexo, preferencialmente, X0/XX (macho/fêmeas), seu número diplóide pode variar de 13 a 28. A maioria dos Pentatomidae apresentam o número diplóide de  $2n=14$  cromossomos, sistema cromossômico do sexo XY/XX e não possuem m-cromossomos. Para o esclarecimento de várias questões, inclusive filogenéticas, um conjunto de dados envolvendo características morfológicas, citogenéticas e moleculares vêm sendo utilizadas para a separação de espécies próximas e, muitas vezes, elucidar a história evolutiva de muitas populações. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo discutir as relações filogenéticas de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências dos genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*) e nas informações morfológicas dos testículos e citogenéticas, afim de observarmos as relações terminais. No nosso estudo observamos que com a inserção do conjunto de dados morfológicos podemos observar alguns agrupamento robustos e uma resolução melhor em relação às tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carporcorini (Pentatomidae). As análises em relação às características morfológicas e citogenéticas e os

agrupamentos buscam indícios para explicações e entendimento das relações filogenéticas, porém, ainda, é uma análise primária e somente com um conjunto de dados ampliado poderá estabelecer as relações.

## INTRODUÇÃO

Os Heteroptera, ou percevejos representam o maior e mais diversificado grupo de insetos com metamorfose incompleta. Eles são tratados como uma subordem dos Hemiptera e, compreendem cerca de 80 famílias, sendo que, a maioria pode ser encontrada em quase todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas (SCHUH; SLATER, 1995).

Algumas espécies são consideradas nocivas como, por exemplo, alguns representantes das Infraordens Cimicomorpha e Pentatomomorpha. Elas incluem, por exemplo, possíveis vetores de doenças tais como o da Doença de Chagas e as pragas de culturas (grãos e pomares). Devido ao grande impacto econômico que esses animais provocam, eles também, se tornaram animais de grande importância econômica e, conseqüentemente fornecendo uma rica fonte de informações biológicas. Apesar de serem considerados prejudiciais, também podem ser úteis como agentes de controle biológico, pois, se alimentam de alguns insetos pragas (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Porém, apesar de sua importância, os estudos sobre este grupo ainda é pouco explorado. Como exemplo, podemos citar a investigação da pigmentação da bainha peritoneal que reveste os testículos (SOUZA et al., 2009). Essas bainhas podem ser avermelhadas, como por exemplo, em algumas espécies de Coreidae (*Anasa bellator*, *Athaumastus haematicus* e *Catorhintha guttula*) (SOUZA et al., 2007a, 2009) e Pentatomidae (*Antiteuchus tripterus*, *Mormidae v-luteum* e *Oebalus sp.*) (SOUZA et al., 2007b, 2008), transparentes como em *Chariesterus armatus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a), alaranjadas (Coreidae- *Anisoscelis foliacea*), ou amareladas (Lygaeidae – *Pachybrachius biliobatus*) (GOMES et al., 2013). Algumas espécies podem ainda possuir duas bainhas da mesma cor ou com cores diferentes, como observado nas espécies da família Pentatomidae (SOUZA et al., 2011).

Outra característica comum entre os Heteroptera e que também é pouco explorada é o número de lobos que formam os testículos, que podem variar de três a sete (SOUZA et al., 2007a). Como exemplo podemos citar as espécies *Mormidae v-luteum* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008) com três lobos; *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008) com quatro; *Zicca annulata* (Coreidae, SOUZA et al.,

2007a) e *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2007b) com seis; e, com sete, *Anasa bellator* e *Athaumastus haematicus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a).

Uma outra característica dos Heteroptera descrita até o momento, somente em algumas espécies de Pentatomidae, é a presença de um lobo testicular com características diferentes dos demais, denominado de lobo *harlequin*. As subfamílias que, geralmente, apresentam este lobo são Edessinae, Pentatominae e Discocephalinae (REBAGLIATTI et al., 2005). Outra diferença observada entre as espécies que possuem o lobo *harlequin*, é que o comportamento das células diferem, principalmente durante a metáfase/anáfase meiótica. Nestas fases os cromossomos podem ser visualizados condensados ou descondensados e, geralmente, essas células são poliplóides e se dividem irregularmente (SOUZA et al., 2007b).

Citogeneticamente, esses insetos possuem além dos cromossomos autossomos, os cromossomos sexuais com diversos sistemas cromossômicos do sexo (X0, XY, múltiplos cromossomos sexuais). Algumas espécies podem possuir, ainda, os m-cromossomos (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000).

Nos Coreidae o sistema cromossômico do sexo, preferencial, é X0/XX (macho/fêmeas). Seu número diplóide pode variar de 13 a 28, porém o mais comum é 21. Esse grupo apresenta uma característica distinta da maioria das espécies que é a presença de um par de m-cromossomos aquiasmáticos (WILSON, 1905; BRESSA et al., 2001). A maioria dos Pentatomidae apresentam o número diplóide de  $2n=14$  cromossomos, sistema cromossômico do sexo XY/XX e não possuem m-cromossomos (SOUZA et al., 2007b, 2008).

Para o esclarecimento de várias questões, vem sendo utilizadas algumas características combinadas. Um exemplo é o trabalho de Weirauch e Schuh (2011) em que relacionaram a sistemática e evolução de Heteroptera demonstrando que estudos morfológicos e citogenéticos podem contribuir para a separação de espécies próximas e, muitas vezes, elucidar a história evolutiva de muitas populações. Porém, muitas vezes somente esses estudos não são suficientes para elucidar todas essas questões.

Assim, as técnicas moleculares estão sendo utilizadas como ferramentas importantes para obtermos melhor resolução, por exemplo, em casos em que a identificação de espécies se torna difícil com base somente em características morfológicas e citogenéticas (SONG et al., 2009). O conhecimento do gene em estudo como sua taxa de evolução, somados com os polimorfismos encontrados nos indivíduos pode relatar sua história evolutiva e aumentar ainda mais as informações resultantes da pesquisa (BROWN, 2003).



Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo discutir as relações filogenéticas de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*) e nucleares (*28S* e *18S*) e nas informações morfológicas dos testículos e citogenéticas, afim de observarmos as relações terminais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado com 25 espécies de Heteroptera, sendo 12 da família Coreidae e 13 de Pentatomidae (Tabela 1). As informações morfológicas e citogenéticas dessas espécies foram obtidas nos trabalhos de SOUZA e colaboradores (2007 a,b,c, 2008, 2009, 2010).

O número de acessos das sequências referentes aos genes *COI*, *16S*, *18S* e *28S* estão descritos na Tabela 1. Para a análise dos dados morfológicos e citogenéticos foi criada uma matriz a partir de informações da literatura que estão descritas na Tabela 2.

O grupo externo escolhido foi *Aphis gossypii* (GLOVER, 1877) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae), considerado grupo-irmão de Heteroptera (CRYAN; URBAN, 2012).

Para as análises de Parcimônia foi criada uma matriz com os dados obtidos e foram realizadas utilizando o Programa WinClada v. 1.00.08 (NIXON, 2002) software TNT (GOLOBOFF et al., 2003) sendo realizados nas seguintes condições: *replication number 1000*, *search per replicas 20* e *strating trees per reps 3*. As árvores foram, posteriormente, avaliadas utilizando o programa FIGTREE 1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referem-se às espécies das tribos Anisoscelidini, Acanthocerini, Chariesterini, Coreini e Leptoscelini da família Coreidae e das tribos Discocephalini, Edessini, Carpocorini, Chlorocorini, Pentatomini, Piezodorini de Pentatomidae utilizando os dados moleculares, morfológicos e citogenéticos.

Analisando a filogenia observamos que as famílias Coreidae e Pentatomidae estão como grupo-irmão com 100% de *bootstrap* e que se apresentam monofiléticas.

Analisando as relações entre as espécies da tribo Anisoscelidini (*Anisoscelis foliacea*, *Leptoglossus gonagra* e *L. zonatus*) não houve a formação de um clado entre estas espécies. *A. foliacea* está agrupada com *Anasa bellator* pertencente à tribo Coreini (Coreidae) e quanto as espécies do gênero *Leptoglossus* (*L. gonagra* e *L. zonatus*), *L. gonagra* aparece externamente ao agrupamento formado entre as espécies de *Dallacoris* (Leptocelini) com *bootstrap* de 88% e *L. zonatus* está externamente a esse agrupamento (Figura 1).

Outra análise realizada levou em consideração as espécies da tribo Coreini (*A. bellator*, *Catorhintha guttula*, *Hypselonotus fulvus*, *Sphictyrtus fasciatus* e *Zicca annulata*). Nesta tribo observamos que *C. guttula*, *H. fulvus* e *S. fasciatus* agruparam-se e *Z. annulata* está externamente às espécies da família Coreidae com *bootstrap* de 95%. Como já relatado a espécie *A. bellator* está agrupada com *A. foliacea* (Figura 1).

Na tribo Leptocelini (Coreidae), representada pelo gênero *Dallacoris* (*D. pictus* e *D. obscura*) observamos um agrupamento com valores de *bootstrap* de 100%. Com relação às tribos Acanthocerini e Chariesterini, pertencentes à família Coreidae, no presente trabalho, só utilizamos um representante de cada tribo, *A. haematicus* (Acanthocerini) e *C. armatus* (Chariesterini), respectivamente, e essas espécies estão agrupadas (Figura 1).

Nas análises das espécies das tribos da família Pentatomidae (Discocephalini, Edessini, Carpocorini, Chlorocorini, Pentatomini e Piezodorini) observamos que em Discocephalini (*Antiteuchus tripterus* e *Platycarenum umbraculatus*) as espécies estão agrupadas e a espécie *Edessa meditabunda*, única representante da tribo Edessini, neste estudo, está externamente a este agrupamento (Figura 1).

As espécies da tribo Carpocorini (*Dichelops melacanthus*, *Euschistus heros*, *Mormidae v-luteum*, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus*) formam um clado sendo que as espécies congênicas de *Oebalus* estão agrupadas (Figura 1).

As espécies da tribo Chlorocorini (*Chlorocoris complanatus* e *Loxa deducta*) não estão agrupadas. *L. deducta* está externa as outras espécies de Pentatomidae com *bootstrap* de 97% e a espécie *Chlorocoris complanatus* não está agrupada à nenhuma espécie. Sobre a tribo Pentatomini a espécie *Thyanta perditor* não está agrupada à nenhuma espécie e *Proxys albopunctulatus* está agrupada com a espécie *Piezodorus guildinii* (Piezodorini) (Figura 1).

Quando comparamos a árvore somente com os dados moleculares (Figura 2) e as árvores com os dados moleculares e morfológicos (Figura 1) observamos que com a inserção do conjunto de dados morfológicos houve uma resolução melhor em relação às tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carpocorini (Pentatomidae). Na tribo Pentatomini e Chlorocorini

apesar das espécies *T. perditor* e *P. albopunctulatus*, e, *C. complanatus* e *L. deducta*, não estarem agrupadas elas estão mais próximas do que nas análises utilizando somente os dados moleculares. Em relação à tribo Carporcorini observamos a formação de um clado com todas as espécies que representam esta tribo, o que foi visualizada apenas em uma análise utilizando somente as informações moleculares.

Como as inconsistências relatadas, anteriormente, já foram evidenciadas em estudos anteriores (GOMES et al., 2013; SOUZA et al., 2013) realizamos uma análise evolutiva utilizando algumas características morfológicas e citogenéticas, isoladamente, para melhor entendermos esses agrupamentos (Figuras 3 a 7).

Se levarmos em consideração o sistema cromossômico do sexo (Coreidae, X0; Pentatomidae XY), presença (Coreidae) ou ausência (Pentatomidae) de m-cromossomo as famílias formam 2 clados distintos (Figura 6), confirmando os dados obtidos somente pelas informações moleculares ou com os dados combinados (Figuras 1 e 2).

Analisando, por exemplo, os agrupamentos formados pela tribo Anisoscelidini (Coreidae) (Figuras 1 e 2), verificamos que as espécies desta tribo não se agruparam, por exemplo, *A. foliacea* não se agrupou com as espécies do gênero *Leptoglossus*, porém encontramos uma relação analisando os dados morfológicos e citogenéticos. *A. foliacea* possui cor da bainha peritoneal alaranjada e complemento cromossômicos  $2n=27$  o que difere das espécies de *Leptoglossus* que possuem cor da bainha avermelhada e complemento cromossômico  $2n=21$  (Figuras 4, 6 e 7).

As espécies de *Leptoglossus* possuem as mesmas características das espécies de *Dallacoris* (Leptocelini), cor da bainha avermelhada e complemento cromossômico  $2n=21$ , e estão externamente a *Dallacoris*, explicando, assim, este agrupamento pelas análises com dados morfológicos e citogenéticos.

A espécie *Zicca annulata* está externamente ao agrupamento da família Coreidae. Cabe ressaltar que ela é a única espécie, do presente estudo, que possui complemento cromossômico de  $2n=23$  e cor da bainha peritoneal amarelada, em relação a sua tribo e é a única que possui quatro lobos testiculares (Figuras 4, 5, 6 e 7).

As espécies da tribo Pentatomini (*P. albopunctulatus* e *T. perditor*) apesar de terem semelhanças como cor da bainha peritoneal avermelhada e complemento cromossômico  $2n=14$  possui diferenças como número de lobos testiculares sendo que a espécie *T. perditor* possui três enquanto *P. albopunctulatus* possui 6, o que faz se assemelhar com a espécie *P. guildinii* (Piezodorini) que além de possuir complemento cromossômico  $2n=14$ , também

possui 6 lobos testiculares. Esse agrupamento entre essas duas espécies já foi evidenciado em outros estudos (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Este estudo foi realizado a fim de entender melhor as relações filogenéticas do grupo e sua futura fixação das relações. Observamos que em comparação com estudos anteriores (GOMES, 2013; SOUZA, 2013) a inserção de dados morfológicos e citogenéticos proporcionou uma melhor resolução de alguns agrupamentos, porém não possibilitou seu estabelecimento.

Uma filogenia robusta necessita de fatores como: catálogos recentes, estudos rigorosos, metodologia cladística atualizada e descrição precisa de caracteres (GRAZIA, 2008) e no grupo dos Heteroptera esses fatores, ainda, são pouco notáveis.

Na comparação entre as árvores, observamos que, com a inserção do conjunto de dados morfológicos, houve uma resolução melhor, em relação às tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carpocorini (Pentatomidae). Em relação à tribo Carpocorini, observamos a formação de um clado.

Foi observado que algumas espécies de tribos diferentes que estão agrupadas possuem características morfológicas semelhantes. Assim, alguns agrupamentos puderam ser entendidos, observando suas características morfológicas, porém esse conjunto de dados ainda é reduzido.

Essa é uma análise inicial deste grupo tão complexo. Assim, uma análise robusta só se torna possível com um extenso conjunto de dados e informações de várias áreas como morfológica, citogenética e moleculares.

## **AGRADECIMENTOS**

Professores Doutores Jocélia Grazia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Luiz Antônio Alves Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro-Museu Nacional) pela identificação das espécies. Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS**

BROWN, T.A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4º Ed. Artmed: Porto Alegre, 2003.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G., MOLA, L.; LARRAMENDY, M.L. Autosomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* and *Jadera sanguinolenta*

(Heteroptera: Rhopalidae: Serinethinae). **European Journal of Entomology**, v. 98, p. 151-157, 2001.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. **T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology**. Program and documentation, available, 2003.

Gomes, M.O. **Relação Filogenética das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseada nas sequências de genes mitocondriais (Cyt b, COI e 16S) e de genes nucleares (18S e 28S)**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2013. Qualificação, Programa de Pós Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2013.

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.

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

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.

RAMBAUT, A. **FigTree v1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2010

REBAGLIATI, P.J.; MOLA, M.L. PAPESCHI, A.G.; GRAZIA, J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review, **Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research**, v. 43, n. 3, p. 199-213, 2005.

SCHAEFER, C.W.; PANIZZI, A.R. **Economic Importance of Heteroptera: A General View**. CRC press, Nature, 2000

SCHUH, T.T.; SLATER, J.A. **True bugs of the world (Hemiptera:Heteroptera) Classification and natural history**. Cornell UNIVERSITY press, Ithaca, New York, xii, 338pp, 1995.

SONG, N.; LIANG, A.; CHUAN, M. The complete mitochondrial genome sequence of the planthopper, *Sivaloka damnosus*. **Journal of Insect Science**, v.10, 2009.

SOUZA, H. V. **Relacionamento Filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes COI, 16S e 18S**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2013. p.38-93. Tese, Programa de Pós Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2013.

SOUZA, H.V.; MURAKAMI, A.S.; MOURA, J.; ALMEIDA, E.C.; MARQUES, I.F.G.; ITOYAMA, M.M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the

family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, p.333-345, 2011.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae), **Psyche**, v.2010, 2010.

SOUZA, H. V.; SOUZA F.B.; MARUYAMA S.R.C.; CASTANHOLE, M.M.U.; ITOYAMA, M. M. Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.4, p. 1383-1396, 2009.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of Ag-staining during meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007a.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007b.

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 doi: [10.1007/s004120050410](https://doi.org/10.1007/s004120050410)

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

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. **Annu. Rev. Entomol.**, v.56, p. 487-510, 2011.

WILSON, E.B. Studies of chromosomes II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotropic chromosomes in Hemiptera. **Journal of Experimental Zoology**, v. 2, p. 507-545, 1905.

Tabela 1. Famílias, Tribos e Espécies utilizadas no presente estudo, com os respectivos números de acessos para as sequências dos genes *COI*, *16S*, *18S* e *28S*.

Família	Tribo	Espécies	Número de acesso					
			<i>COI</i>		<i>16S</i>	<i>18S</i>	<i>28S</i>	
			Região 1	Região 2				
Coreidae	Anisoscelidini	<i>Anisoscelis foliacea</i>	JQ037895	JQ218470	KC537034	KC537009	KC796318	
		<i>Leptoglossus gonagra</i>	JQ037902	JQ218477	KC537041	KC537016	KC796320	
		<i>Leptoglossus zonatus</i>	JQ037903	JQ218478	KC537042	KC537017	KC796321	
	Acanthocerini	<i>Athaumastus haematicus</i>	JQ037896	JQ218471	KC537035	KC537010	KC796322	
	Chariesterini	<i>Chariesterus armatus</i>	JQ037898	JQ218473	KC537037	KC537012	KC796324	
	Coreini	<i>Anasa bellator</i>	JQ031214	JQ218469	KC537033	KC537008	KC796325	
		<i>Catorhintha guttula</i>	JQ037897	JQ218472	KC537036	KC537011	KC796326	
		<i>Hypselonotus fulvus</i>	JQ037901	JQ218476	KC537040	KC537015	KC796328	
		<i>Sphictyrtus fasciatus</i>	JQ037904	JQ218479	KC537043	KC537018	KC796329	
		<i>Zicca annulata</i>	JQ037905	JQ218480	KC537044	KC537019	KC796331	
	Leptoscelini	<i>Dallacoris obscura</i>	JQ037899	JQ218474	KC537038	KC537013	KC796332	
		<i>Dallacoris pictus</i>	JQ037900	JQ218475	KC537039	KC537014	KC796333	
	Pentatomidae	Discocephalini	<i>Antiteuchus tripterus</i>	JQ218456	JQ218481	KC537020	KC537045	KC796334
			<i>Platycarenum umbraculatus</i>	JQ218466	JQ218491	KC537030	KC537055	KC796336
		Edessini	<i>Edessa meditabunda</i>	JQ218459	JQ218484	KC537023	KC537048	KC796337
Carpocorini		<i>Dichelops melacanthus</i>	JQ218458	JQ218483	KC537022	KC537047	KC796339	
		<i>Euschistus heros</i>	JQ218460	JQ218485	KC537024	KC537049	KC796340	
		<i>Mormidae v-luteum</i>	JQ218462	JQ218487	KC537026	KC537051	KC796342	
		<i>Oebalus poecilus</i>	JQ218463	JQ218488	KC537028	KC537053	KC796345	
		<i>Oebalus ypsilongriseus</i>	JQ218464	JQ218489	KC537027	KC537052	KC796344	
Chlorocorini		<i>Chlorocoris complanatus</i>	JQ218457	JQ218482	KC537021	KC537046	KC796347	
		<i>Loxa deducta</i>	JQ218461	JQ218486	KC537025	KC537050	KC796348	
Pentatomini		<i>Proxys albopunctulatus</i>	JQ218467	JQ218492	KC537031	KC537056	KC796349	
		<i>Thyanta perditor</i>	JQ218468	JQ218493	KC537032	KC537057	KC796351	
Piezodorini		<i>Piezodorus guildinii</i>	JQ218465	JQ218490	KC537029	KC537054	KC796353	

Fonte: Gomes (2013)

Tabela 2. Famílias e espécies de Heteroptera utilizadas no presente estudo, com os respectivos dados referentes aos aspectos morfológicos (quantidade e pigmentação da bainha, número de lobos e lobo harlequin) e citogenéticos (Polimegalia e cariótipo).

Família	Espécies	Quantidade	Pigmentação da Bainha		N. de lobos	Lobo	Polimegalia	Cariótipo (2n)	Referência
		Bainha	Peritoneal	testiculares	harlequin				
<b>Coreidae</b>	<i>Anisoscelis foliacea</i>	1	Alaranjada		7	-	-	27= 24A+ 2m+XO	Souza et al.(2012)**
	<i>Leptoglossus gonagra</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18A +2m+XO	Souza et al. (2007a)
	<i>Leptoglossus zonatus</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18A +2m+XO	Souza et al. (2007a)
	<i>Athaumastus haematicus</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18A +2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Chariesterus armatus</i>	1	Transparente		4	-	-	25= 22A+2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Anasa bellator</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18 A+2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Catorhintha guttula</i>	1	Alaranjada		7	-	-	25= 22A +2m+XO	Souza et al. (2009)
	<i>Hypselonotus fulvus</i>	1	Alaranjada		7	-	-	19= 16 A+2m+XO	Souza et al. (2009)
	<i>Sphictyrtus fasciatus</i>	1	Avermelhada		7	-	-	19= 16A +2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Zicca amulata</i>	1	Amarela		4	-	-	23= 20A+2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Dallacoris obscura</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18A+2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<i>Dallacoris pictus</i>	1	Avermelhada		7	-	-	21= 18A+2m+XO	Souza et al.(2007a)
	<b>Pentatomidae</b>	<i>Antiteuchus tripterus</i>	1	Avermelhada		6*	5	4 e 6	14 = 12A+ XY
<i>Platycarenum umbraculatus</i>		1	Avermelhada		7	-	-	14 = 12A+ XY	Souza, Itoyama (2011)
<i>Edessa mediatubunda</i>		2	Externa amarela e interna avermelhada		4	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)
<i>Dichelops melacanthus</i>		1	Avermelhada		6	-	-	12 = 10A+ XY	Souza, Itoyama (2010)
<i>Euschistus heros</i>		1	Avermelhada		6	-	4 e 6	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2008)
<i>Mormidae v-luteum</i>		1	Avermelhada		3	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2008)
<i>Oebalus poecilus</i>		1	Avermelhada		3	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2008)
<i>Oebalus ypsilongriseus</i>		1	Avermelhada		3	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2007b)
<i>Chlorocoris complanatus</i>		2	Interna e externa amarelada		7	5	4 e 6	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)
<i>Loxa deducta</i>		2	Interna e externa amarelada		7	5	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)
<i>Proxys albopunctulatus</i>		1	Avermelhada		6	-	4 e 6	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)
<i>Thyanta perditor</i>		1	Avermelhada		3	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)
<i>Piezodorus guildinii</i> ,	2	Externa amarelada e interna avermelhada		6	-	-	14 = 12A+ XY	Souza et al. (2011)	

\*o lobo 6 está interno ao lobo 5, \*\* unpublsh



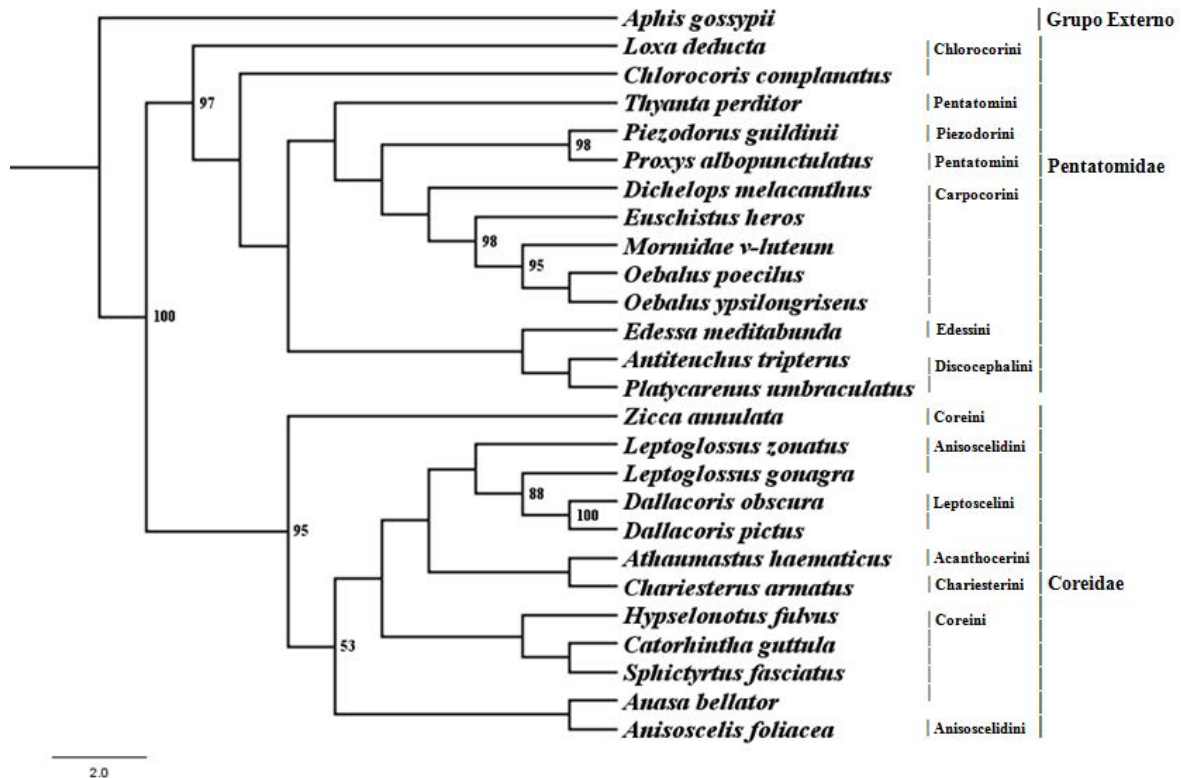


Figura 1. Árvore filogenética de acordo com as sequências concatenadas dos genes *Cyt b*, *COI*, *16S*, *18S* e *28S* e informações morfológicas dos testículos e complemento cromossômico de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando o Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

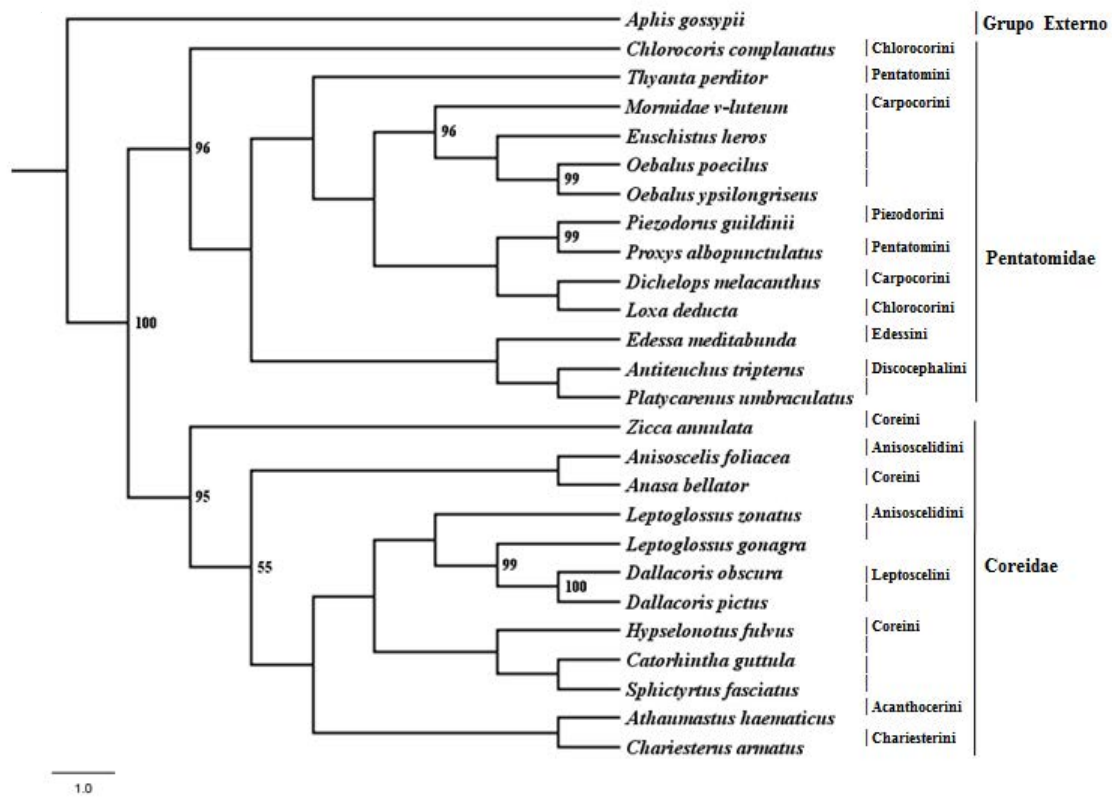


Figura 2. Árvore filogenética de acordo com as sequências concatenadas dos genes mitocondriais *Cyt b*, *COI* e *16S* e nucleares *18S* e *28S* de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) utilizando o Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

Fonte: GOMES (2013)

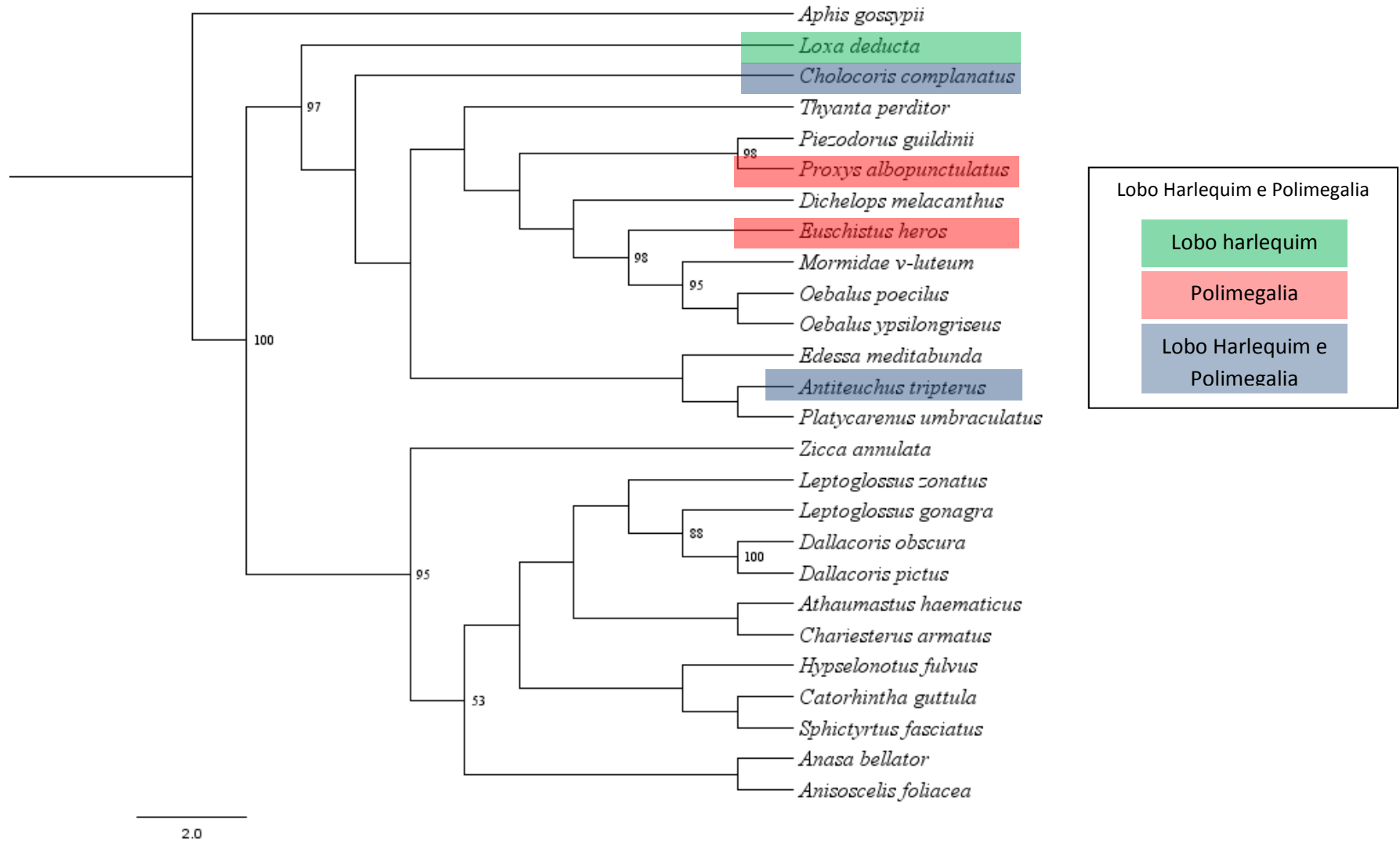


Figura 3. Distribuição do lobo testicular harlequim e da presença de células com polimegalia de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) inferida pela filogenia obtida por meio do Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

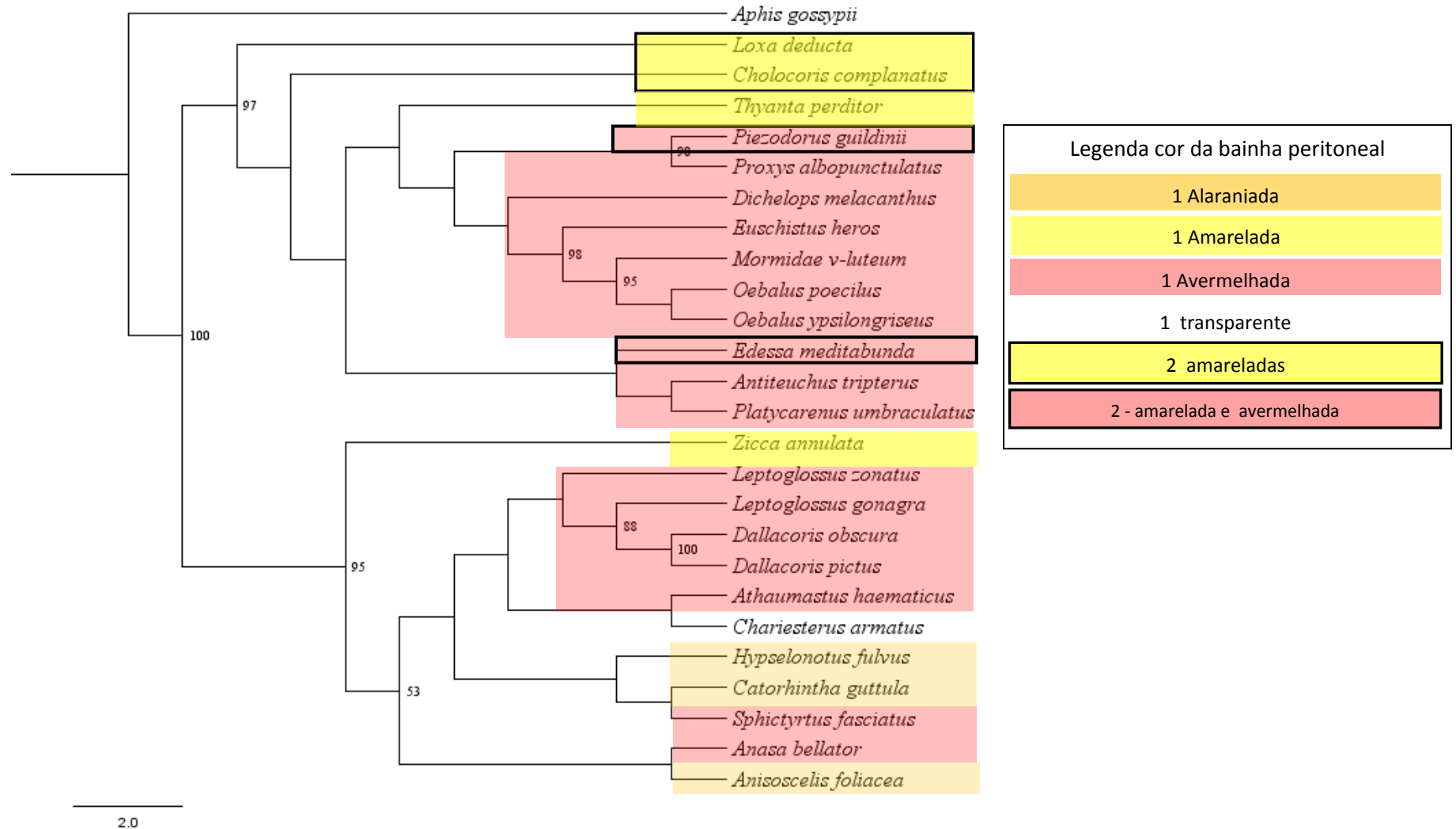


Figura 4. Distribuição da pigmentação da bainha peritoneal de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) inferida pela filogenia obtida por meio do Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

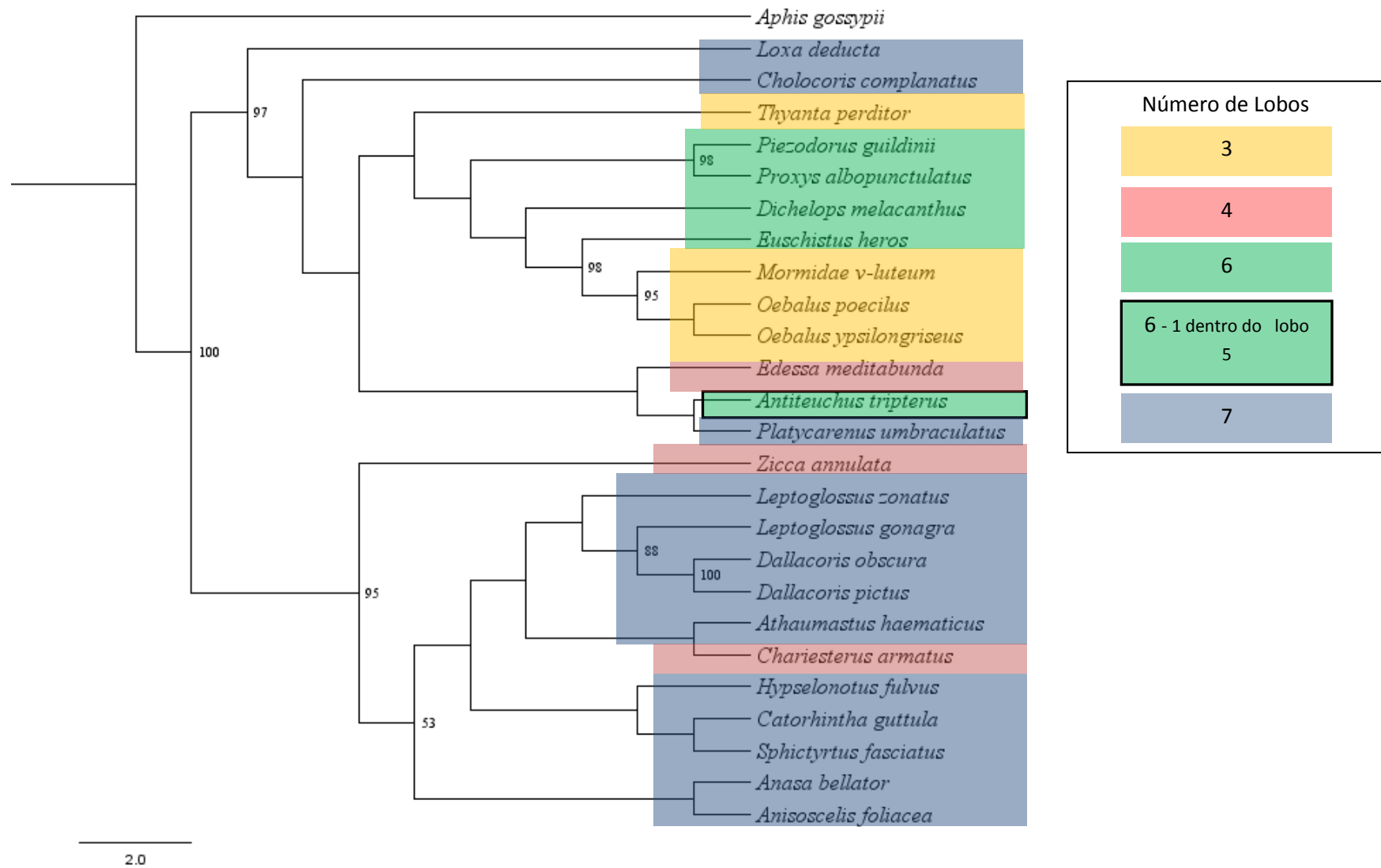


Figura 5. Distribuição do número de lobos testicular de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) inferida pela filogenia obtida por meio do Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

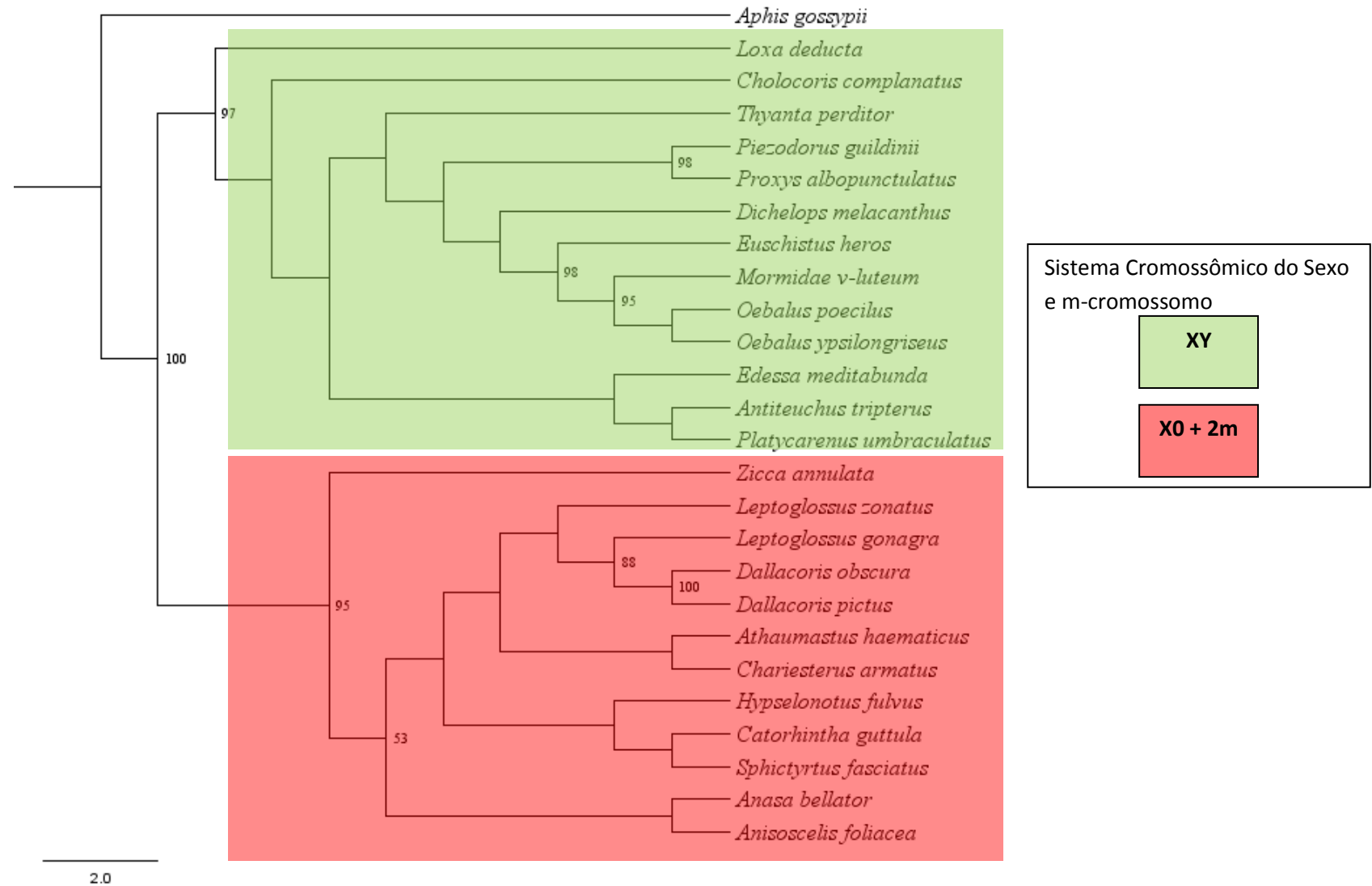


Figura6. Distribuição do sistema cromossômico do sexo de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) inferida pela filogenia obtida por meio do Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.

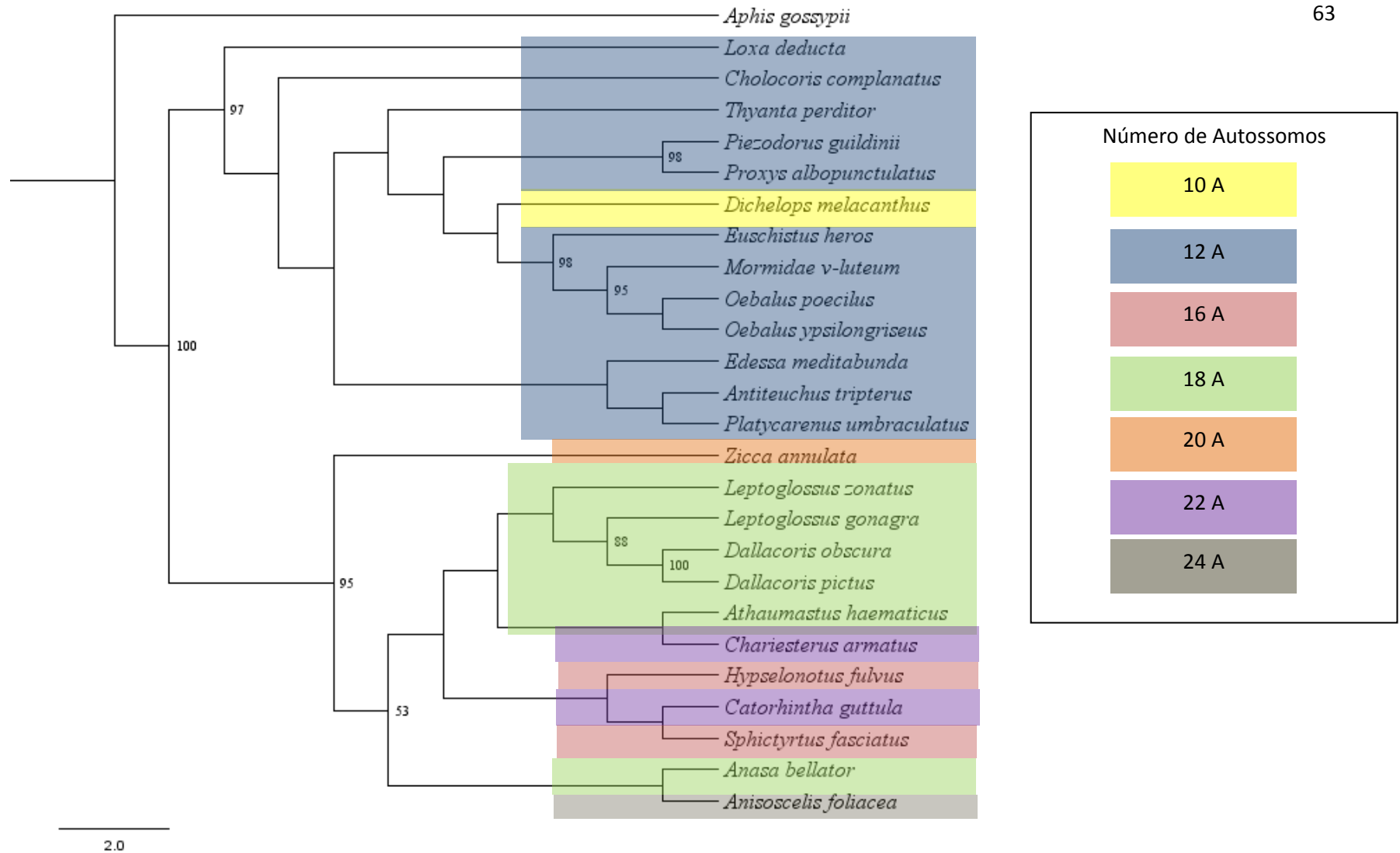


Figura 7. Distribuição do complemento cromossômico de 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) inferida pela filogenia obtida por meio do Método de Parcimônia (P). Os valores do *bootstrap* superiores a 50 estão representados à frente dos nós.





**Morphological Aspects of the testes of 18 species of terrestrial of  
Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil)**

**Morphological Aspects of the testes of Heteroptera from Northwestern São  
Paulo (Brazil)**

Mariana Oliveira Gomes<sup>1</sup>, Márcia Maria Urbanin Castanhole<sup>1</sup>, Hederson Vinicius de Souza<sup>1</sup>, Aline Sumitani Murakami<sup>1</sup>, Tatiani Seni de Souza Firmino<sup>1</sup>, Priscila Samara Saran<sup>1</sup>, Cecilia Artico Banho<sup>1</sup>, Leticia da Silva Monteiro<sup>1</sup>, Jocielly Cristina Pereira da Silva<sup>1</sup>, Mary Massumi Itoyama<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. <http://www.ibilce.unesp.br/>.

Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto

<sup>2</sup> Corresponding Author: Mary Massumi Itoyama, e-mail: [mary@ibilce.unesp.br](mailto:mary@ibilce.unesp.br)

Submetido em: 20 de agosto de 2012.

Aceito: 30 de agosto de 2013

Biota Neotropica, vol. 13, no. 3

**Abstract:** The Heteroptera are known for their odour, for being pests or for being disease carriers. However, they are still not extensively studied, perhaps because they form a very large group.

Therefore, with the aim of enhancing the knowledge of the morphology of the testes of this insect order, we collected and analysed 18 species of terrestrial Heteroptera from the northwestern part of São Paulo. The analysis of these species revealed some differences between the testicles of these species, including their shape (elongated, oval, round or pecten), the morphology of the testicular lobes (elongated and paired side by side or united in a single

region), the colours of the peritoneal sheath that surrounds the lobes (red, orange, yellow or translucent), and the number of testicular lobes (one, two, four, five, six or seven). Because the aspects analysed were highly variable, our study suggests a need for further analysis of Heteropteran testicular morphological differences.

**Keywords:** testicles, peritoneal sheath, lobes.

**Resumo:** Os Heteroptera são organismos conhecidos pelo seu odor, por serem pragas ou por serem transmissores de doenças, contudo, eles ainda são pouco estudados, talvez por formarem um grupo muito grande. Portanto, com o objetivo de ampliarmos as informações dos aspectos testiculares deste grupo analisamos 18 espécies de Heteroptera terrestres pertencentes a oito famílias que foram coletadas no Noroeste Paulista. As análises dessas espécies mostraram-nos algumas diferenças testiculares quanto: a sua forma (alongadas; ovaladas; forma de concha, denominada pecten; ou arredondados); a morfologia dos lobos (alongados e pareados lado a lado ou unidos em uma única região, na forma de um “ofiuróide”); às cores da bainha peritoneal (alaranjada, amarelada, avermelhada ou transparente); ao número de lobos testiculares (um, dois, quatro, cinco, seis, sete). Devido aos aspectos analisados serem muito variáveis, nosso estudo sugere um aprofundamento maior na questão que envolve as diferenças morfológicas testiculares.

**Palavras-Chave:** testículos, bainha peritoneal, lobos

## Introduction

The Hemiptera are distributed worldwide and represent the most diverse non-Endopterygotan orders, with more than 90.000 species in approximately 140 families. Historically, this order was divided into two suborders: Heteroptera (bugs) and Homoptera (cicadas, leafhoppers, aphids, whiteflies and coccids) (Gullane & Cranston 2008). Currently, the Hemiptera order is divided into three suborders: Auchenorrhyncha, Heteroptera and Sternorrhyncha (Cryan & Urban 2012).

The Heteroptera possess great variation in feeding behaviours, with the majority depending exclusively on plant sap, but with additional non-phytophagous species that are predators of fungi and other arthropods and a few species that are blood-sucking or necrophagous (Gullane & Cranston 2008).

Because the majority of Heteroptera are phytophagous, they can directly affect humans by causing serious damage to agricultural products including fruits (oranges, cashews and tomatoes) and grains (beans, corn and soy) that are used for food or drugs and also by affecting the food chain or transmitting diseases to plants. The economic importance of various Heteroptera also includes many species that are beneficial because they consume destructive insect pests. Some species are ectoparasites of humans and domestic animals, whereas others are hosts and transmitters of serious diseases to humans (Schuh & Slater 1995).

The suborder Heteroptera includes approximately 80 families; among these, the Alydidae, Coreidae, Corimelaenidae, Lygaeidae, Reduviidae, Rhopalidae, Scutelleridae and Tingidae have the largest amounts of terrestrial representatives in the region of São José do Rio Preto (Northwest São Paulo, Brazil).

The Alydidae insects are relatively small and are generally found across North America in foliage and flowers (Froeschner 1988). The species of the Coreidae family are widely distributed, although this species is the most abundant in tropical and subtropical regions and is physically the largest in these regions. Most of the Coreidae have unusual appearances and significant economic importance (Schuh & Slater 1995).

The species of the Corimelaenidae family are treated by some authors as a subfamily of Cydnidae and represent approximately 200 species and nine genera that are distributed in the Western Hemisphere. They are small-to-medium-sized, dark coloured and have a developed convex scutellum covering most of the forewing with a yellowish exochorion (Grazia et al. 1999).

The representatives of the Lygaeidae family are commonly known as seed insects; therefore, these insects have long proboscises that are used to drill and inject enzymes into the seeds (Schuh & Slater 1995).

Among the Heteroptera, the family Reduviidae is distinguished for being insectivorous, phytophagous, and hematophagous, and it is therefore of great importance for agricultural productivity and human health, as family members can transmit Chagas disease during feeding. Because they are larger in size than other insect predators, Reduviidae consumes a higher number and also a broader spectrum of prey species (Panzeria et al. 1992).

The species of the Rhopalidae family are distributed worldwide; all members are phytophagous and live mainly in weeds, but some are arboreal (Schuh & Slater 1995). The Scutelleridae family is a small family that was previously considered part of the Pentatomidae but has now been separated. Scutelleridae species size can vary from medium to large, and they have a worldwide distribution, with 80 genera and 450 species. The most notable feature of the Scutelleridae is the scutellum, which overlaps the entire abdomen, hiding their wings and giving them the appearance of a beetle. These insects feed on grasses, herbs, fruits and flowers (Papeschi & Bressa 2006).

The Tingidae family is composed of very small insects (2-10 mm) that have a reticulated surface in their wings. These insects are located on the abaxial surface of leaves, where they suck sap and cause yellowing and premature senescence, causing great damage. Each individual completes the life cycle in the same plant, sometimes within the same region. Most species produce one or two generations per year, but some species produce several generations per year. Some species hibernate as adults, while others hibernate at the egg or nymph stages (Miller 2004).

The suborder Heteroptera is extremely large, with over 40.000 described species, but this number is clearly higher because many others species have yet to be described. Despite this high number of species and their wide distribution, studies regarding

these insects are still very scarce and are mainly related to aspects of testicular morphology (colour of the peritoneal sheath, the testicular shape, and number and morphology of the lobes) (Souza et al. 2007a, 2010).

The analyses of testes variations between different groups of Heteroptera offer indications that should help behavioural and evolutionary studies. With the aim of improving the available information concerning the morphology of this organ, we analysed 18 species of Heteroptera belonging to eight families.

## Material and Methods

The present study analysed 18 species of terrestrial Heteroptera belonging to eight families: *Neomegalotomus parvus* (Westwood, 1842) and *Stenocoris furcifera* (Westwood, 1842) (Alydidae); *Acanonicus hahni* (Stål, 1860), *Acanthocephala* sp. and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas, 1852) (Coreidae); *Galgupha sidae* (McAtee ; Malloch, 1933) (Corimelaenidae); *Oncopeltus fasciatus* (Stal, 1868), *Oxycarenus hyalinipennis* (Costa, 1847) and *Pachybrachius bilobatus* (Say, 1831) (Lygaeidae); *Atopozelus opsimus* (Elkins, 1954) and *Doldina carinulata* (Stål, 1859) (Reduviidae); *Harmostes apicatus* (Stål, 1860), *Harmostes serratus* (Fabricius, 1775), *Jadera haematoloma* (Herrich-Schaeffer, 1847), *Jadera sanguinolenta* (Fabricius, 1775) and *Jadera* sp. (Rhopalidae); *Pachycoris torridus* (Scopoli, 1772) (Scutelleridae); and *Dictyla monotropidia* (Stål, 1858) (Tingidae).

To characterise testicular morphology, the males were first pricked with pins through the scutellum region in Petri dishes containing paraffin. With the aid of two stylets, abdominal incisions were made, and the testes were removed. Each testes was placed on a histological slide containing one drop of saline (Demerec) for the observation of their morphology, the colour of the peritoneal sheath, the morphology of the lobes and the number of testicular lobes. The observations were performed using a Stemi DV4-Zeiss stereomicroscope.

## Results

The testicles of the Heteroptera species analysed had different-shaped testes, including oval (*Neomegalotomus parvus*, *Oncopeltus fasciatus* and *Pachycoris torridus*) (Figure 1a), pecten (*Acanonicus hahni*, *Acanthocephala* sp. and *Anisoscelis foliacea*) and elongated (*Stenocoris furcifera*, *Galgupha sidae*, *Oxycarenus hyalinipennis*, *Pachybrachius bilobatus*, *Harmostes serratus*, *Harmostes apicatus*, *Jadera haematoloma*, *Jadera sanguinolenta*, *Jadera* sp. and *Dictyla monotropidia*, *Atopozelus opsimus* and *Doldina carinulata*) (Figure 1c-e) (Table 1). All the testicular lobes are morphologically elongated and paired side by side, with the exception of the Reduviidae family species, in which the lobes are stretched but united in a single region (Figure 1e) (Table 1).

The analysis of the peritoneal sheath revealed different pigmentations: yellow (*Oncopeltus fasciatus* and *Pachybrachius bilobatus*) (Figure 1a), orange (*Acanonicus hahni*, *Anisoscelis foliacea marginella*, *Galgupha sidae*, *Doldina carinulata*, *Harmostes serratus* and *Jadera sanguinolenta*) (Figure 1b), reddish (*Stenocoris furcifera*, *Neomegalotomus parvus*, *Acanthocephala* sp., *Oxycarenus hyalinipennis*, *Harmostes apicatus*, *Jadera haematoloma* and *Jadera* sp.) (Figure 1c) and transparent (*Atopozelus opsimus*, *Pachycoris torridus* and *Dictyla monotropidia*), (Figure 1d,e) (Table 1).

Another feature observed was the number of testicular lobes. All species of the Alydidae (except *Stenocoris furcifera*), Coreidae, Lygaeidae (except *Oxycarenus hyalinipennis*), Reduviidae and Scutelleridae families had seven testicular lobes, the noted exceptions had six and two lobes, respectively. Rhopalidae had four lobes, with the exception of the *Jadera* sp., which had five. Corimelaenidae and Tingidae had two and one lobes, respectively (Table 1).

## Discussion

Although there is not much mention in the literature concerning the morphology of the testicles of Heteroptera, the analysis of this organ has been very important because it presents very interesting features. According to the literature, the testicles of

Heteroptera can be elongated, as observed in the species of the Gerridae (Castanhole et al. 2008, 2010) and Pentatomidae families (Souza et al. 2007a, 2010, 2011), or as observed in the present study, they can be oval (Alydidae, and Scutelleridae Lygaeidae) or pectin-shaped (Coreidae). Another feature observed in our study was the morphology of the testicular lobes. The testicular lobes are elongated and separated in most of the species analysed, with the exception of the species of the Reduviidae family, in which the testicular lobes were united in a single region. With respect to these characteristics, we did not observe any relationships with the family to which they belong or feeding habits or habitat.

One feature that has been widely explored in Heteroptera is the pigmentation of the peritoneal sheath that covers the testicular lobes. For example, there are descriptions in the literature of a reddish peritoneal sheath in species of the Alydidae (Souza et al. 2009), Coreidae (Souza et al. 2007b, 2009), Lygaeidae (Souza et al. 2007c), Pentatomidae (Souza et al. 2007a, 2008) and Rhopalidae (Souza et al. 2009) families and yellowish or transparent sheaths some species of the Coreidae (Souza et al. 2007b) and Gerridae families (Castanhole et al. 2008). Testicles with two membranes of the same pigmentation (yellowish) or different pigmentations (yellowish external and reddish internal) can also be observed, as in species of the Pentatomidae family (Souza et al. 2011). Therefore, there is no standard with which we can relate the colour of the sheath to the family. However, to date, all aquatic insects observed had a transparent sheath (Castanhole et al. 2008, 2010). The terrestrial species analysed in this study confirm this hypothesis because species of the same family had sheaths of different colours, although there were few species analysed.

The testicles of Heteroptera are formed by varying numbers of lobes. Seven lobes have been described in species of the Alydidae (Souza et al. 2009); Coreidae (Souza et al. 2007b, 2009); Pentatomidae (Souza et al. 2011) and Rhopalidae families (Souza et al. 2009); six lobes in species of the Pentatomidae family (Souza et al. 2007a, 2010, 2011), five lobes in the Alydidae family (Souza et al. 2009), four lobes in species of the Pentatomidae (Souza et al. 2008, 2011) and Coreidae families (Souza et al. 2007b), three lobes in species of the Pentatomidae family (Souza et al. 2008, 2011) and two lobes in the Gerridae family (Castanhole et al. 2008, 2010). From our results, we can note that the number of testicular lobes do not present a pattern within the families because the two Alydidae species analysed had different numbers of lobes (six and seven), although seven lobes were also found by Souza et al. (2009). With regard to the Coreidae family, most species described in the literature and all species analysed in this study had seven testicular lobes. The lobe count

results for the Corimelaenidae (two), Lygaeidae (two, seven), Reduviidae (seven), Scutelleridae (seven) and Tingidae (one) families represent the first analysis of lobe number in these families.

As the aspects analysed were variable, we suggest that Heteroptera require further morphological study to define the characteristics of the ancestral species with respect to the colour of the peritoneal sheath and the number of testicular lobes, the features that were more variable among the species analysed.

### Acknowledgements

This work was performed with the assistance of FAPESP, CAPES, CNPq and FUNDUNESP for financial support and Dr. Antonio Luis Alves Costa, University of Rio de Janeiro, RJ; Dr. Jose Antonio Marin Fernandes, University Federal of Pará, PA; and Dr. Helcio Gil Santana, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro for the identification of insects.

### References

- CASTANHOLE, M.M.U., PEREIRA, L.L.V., SOUZA, H.V., BICUDO, H.E.M.C., COSTA, L.A.A. & M.M. ITOYAMA. 2008. 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.* 7(4):1398-1407.
- CASTANHOLE, M.M.U., PEREIRA, L.L.V., SOUZA H.V. & ITOYAMA M.M. 2010. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). *Genet. Mol. Res.* 9 (3): 1343-1356.
- CRYAN, J.R . & URBAN, J.M. 2012. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Syst. Entomol.* 37:7-21.
- FROESCHNER, R.C. 1988. Family Alydidae Amyot and Serville, 1843. Pp. 4-11. In *Catalog of the Heteroptera, or True Bugs, of Canada and the Continental United States* (Henry, T. J. & Froeschner, R.C. [eds.], Brill, E. J.) London, U.K. 658 pp.
- GRAZIA, J., FORTES, N.D.F., CAMPOS, L. A. 1999. Pentatomoidea. In *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*, 5: invertebrados



terrestres (Joly, C. A. & Bicudo, C. E.M. (Org.)). São Paulo, v. 5, p. 101-11.

GULLAN, P.J. & CRANSTON, P.S. 2008. Os insetos: um resumo de entomologia. 3rd ed. Roca, São Paulo.

MILLER, L.T. 2004. Lace bugs (Hemiptera: Tingidae). In: Enciclopedia of Entomology (Capinera, J.L. ed). v. 2. p. 1238-1241.

PANZERA, F., ALVAREZ, F., SANCHEZ-RUFAS, J., PEREZ, R., SUJA, J.A., SCOVORTZOFF, E., DUJARDIN, J.P., ESTRAMIL, E. & SALVATILLAR, R. 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera – Reduviidae). *Genome*. 35:1068-1074.

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

SCHUH, T.T. & SLATER, J.A. 1995. The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): Classification and natural history, Cornell UNIVERSITY press.

SOUZA, H.V., BICUDO, H.E.M.C., COSTA, L.A.A. & ITOYAMA, M.M. 2007a. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Eur. J. Entomol.* 104:353-362.

SOUZA, H.V., ARAKAKI, R.L.M., DIAS, L.N., MURAKAMI, A.S., COSTA, L.A.A., BICUDO, H.E.M.C. & ITOYAMA, M.M. 2007b. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). *Cytologia*. 72: 49-56.

SOUZA, H.V., BICUDO, H.E.M.C. & ITOYAMA, M.M. 2007c. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Genet. Mol. Res.* 6: 33-40.

SOUZA, H.V., CASTANHOLE, M.M.U., BICUDO, H.E.M.C., COSTA, L.A.A. & ITOYAMA, M.M. 2008. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). *Genet. Mol. Res.* 31: 686-691.

SOUZA, H.V., SOUZA, F.B., MARUYAMA, S.R.C, CASTANHOLE, M.M.U & ITOYAMA, M.M. 2009. Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. *Genet. Mol. Res.* 8(4):1383 – 1396.

SOUZA, H.V. & ITOYAMA M.M. 2010. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche: J Entomol.* 2010:10 pp.

SOUZA, H.V. & ITOYAMA, M.M. 2011. Comparative analysis of heteropycnotic chromatin and silver-stained material in *Platycarenum umbratulus* (Pentatomidae: Discocephalinae). *Inv. Reprod. Devel.* 55(2): 65–72.

Table 1. Morphology of testes and testicular lobes, peritoneal sheath colour and number of testicular lobes of 18 species of Heteroptera.

Family	Specie	Morphology of testes	Morphology of lobes	Peritoneal sheath	Number of lobes
Alydidae	<i>Neomegalotomus parvus</i> (Westwood, 1842)	Oval	Elongated/Separate	Reddish	7
	<i>Stenocoris furcifera</i> (Westwood, 1842)	Elongated	Elongated/Separate	Reddish	6
Coreidae	<i>Acanonicus hahni</i> (Stål, 1860)	Pecten-shaped	Elongated/Separate	Orange	7
	<i>Acantocephala</i> sp.	Pecten-shaped	Elongated/Separate	Reddish	7
	<i>Anisoscelis foliacea marginella</i> (Dallas, 1852)	Pecten-shaped	Elongated/Separate	Orange	7
Corimelaenidae	<i>Galgupha sidae</i> (McAtee ; Malloch, 1933)	Elongated	Elongated/Separate	Orange	2
Lygaeidae	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Stal, 1868)	Oval	Elongated/Separate	Yellowish	7
	<i>Oxycarenus hyalinipennis</i> (Costa, 1847)	Elongated	Elongated/Separate	Reddish	2
	<i>Pachybrachius bilobatus</i> (Say, 1831)	Elongated	Elongated/Separate	Yellowish	7
Reduviidae	<i>Atopozelus opsimus</i> (Elkins, 1954)	Elongated	Attached to a region	Transparent	7
	<i>Doldina carinulata</i> (Stål, 1859)	Elongated	Attached to a region Elongated/Separate	Orange	7
Rhopalidae	<i>Harmostes apicatus</i> (Stål, 1860)	Elongated	Elongated/Separate	Reddish	4
	<i>Harmostes serratus</i> (Fabricius, 1775)	Elongated	Elongated/Separate	Orange	4
	<i>Jadera haematoloma</i> (Herrich-Schaeffer, 1847)	Elongated	Elongated/Separate	Reddish	4
	<i>Jadera sanguinolenta</i> (Fabricius, 1775)	Elongated	Elongated/Separate	Orange	4
	<i>Jadera</i> sp.			Reddish	5
Scutelleridae	<i>Pachycoris torridus</i> (Scopoli, 1772)	Oval	Elongated/Separate	Transparent	7
Tingidae	<i>Dictyla monotropidia</i> (Stål, 1858)	Elongated	Elongated	Transparent	1



Figure 1. Testicles of terrestrial Heteroptera. a) Oval (*Oncopeltus fasciatus*), b) pecten-shaped (*Anisoscelis foliacea marginella*), and c-e) elongated (c: *Oxycarenus hyalinipennis*; d, e: *Atopozelus opsimus*) testicular lobes attached to a region. Bar: 1 mm



## Meiotic behaviour of 18 species from eight families of terrestrial Heteroptera

Hederson Vinicius de SOUZA<sup>1a</sup>, Márcia Maria Urbanin CASTANHOLE<sup>1b</sup>, Mariana Oliveira GOMES<sup>1c</sup>, Aline Sumitani MURAKAMI<sup>1d</sup>, Tatiani Seni de Souza FIRMINO<sup>1e</sup>, Priscila Samara SARAN<sup>1f</sup>, Cecilia Artico BANHO<sup>1g</sup>, Letícia da Silva MONTEIRO<sup>1h</sup>, Jocielly Cristina Pereira da SILVA<sup>1i</sup> and Mary Massumi ITOYAMA<sup>1j</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Correspondence: <sup>a</sup> souzahv@gmail.com, <sup>b</sup> marcinha.uc@gmail.com, <sup>c</sup> mariana.oliveiragomes@gmail.com, <sup>d</sup> alinemurakami@yahoo.com.br, <sup>e</sup> tatseni@hotmail.com, <sup>f</sup> samarapri@gmail.com, <sup>g</sup> ce\_artico@hotmail.com, <sup>h</sup> leeticia\_monteiro@hotmail.com, <sup>i</sup> jocyrosa22@hotmail.com, <sup>j</sup> mary@ibilce.unesp.br

Submetido: 04 de novembro de 2012

Aceito: 18 de março de 2013

Journal of Insect Science

Keywords: Chromosomes, holocentric, cytogenetic, Meiosis

**Abstract:** Insects of the suborder Heteroptera are known for their odour, for being pests or for being disease carriers. To gain better insight into the cytogenetic characteristics of heteropterans, 18 species of terrestrial Heteroptera belonging to eight families were studied. The presence of heteropycnotic corpuscles during prophase I, terminal or interstitial chiasmata, telomeric associations between chromosomes, ring disjunctions of autosomes during metaphase, and late migrations of the sex chromosomes during anaphase were analyzed. These features showed identical patterns to other species of Heteroptera previously described in the literature. Another studied characteristic was chromosome complements. The male chromosome complements observed were  $2n=12$  chromosomes [ $10A + XY$ , *Galgupha sidae* (Corimelaenidae) and *Pachycoris torridus* (Scutelleridae)];  $2n=13$  [ $10A + 2m + X0$ , *Harmostes serratus*, *Harmostes apicatus*, *Jadera haematoloma*, *Jadera sanguinolenta*, *Jadera* sp. (Rhopalidae) and *Neomegalotomus parvus* (Alydidae)];  $2n=13$  [ $12A + X0$ , *Stenocoris furcifera* (Alydidae)];  $2n=14$  [ $12A + XY$ , *Dictyla monotropidia* (Tingidae)];  $2n=19$  [ $18A +$

X0, *Acanonicus hahni* (Coreidae)];  $2n= 21$  [ $18A + 2m + X0$ , *Acanthocephala* sp.( Coreidae)];  $2n= 27$  [ $24A + 2m + X0$ , *Anisoscelis foliacea marginella* (Coreidae)];  $2n= 18$  [ $16A + XY$ , *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae)];  $2n= 17$  [ $14A + X_1X_2Y$ , *Oxycarenum hyalinipennis* (Lygaeidae)];  $2n= 16$  [ $12A + 2m + XY$ , *Pachybrachius bilobatus* (Lygaeidae)];  $2n=26$  [ $24A + XY$ , *Atopozelus opsinus* (Reduviidae)]; and  $2n= 27$  [ $24A + X_1X_2Y$ , *Doldina carinulata* (Reduviidae)]. The diversity of the cytogenetic characteristics of Heteroptera was reflected in the 18 studied species. Thus, this study extends the knowledge of these characteristics, such as the variations related to the chromosome complements, the sex chromosome systems and the meiotic behaviour.

## INTRODUCTION

Insects in the order Hemiptera are distributed worldwide and comprise the most diverse order, besides endopterygota, with more than 90,000 extant species in approximately 140 families. Historically, Hemipterans were divided into two suborders: Heteroptera (bugs) and Homoptera (cicads, leafhoppers, aphids, whiteflies and coccids) (Gullan and Cranston 2008). Currently, the order Hemiptera is divided into three suborders: Auchenorrhyncha, Heteroptera and Sternorrhyncha (Liang and Webb 2002).

Heteropterans possess a wide variety of feeding behaviours, but the majority rely exclusively on plant sap. There are also Heteroptera species that are predators of fungi and other arthropods, and other species are bloodsucking or necrophagous (Gullan and Cranston 2008).

Regarding cytogenetics, Heteroptera are characterised by holocentric chromosomes, in which the kinetochore structure is absent in meiotic cells (Motzko and Ruthmann 1984; Rufas and Giménez-Martín 1986; Wolf 1996) and kinetic activity is restricted to the chromosome ends (Motzko and Ruthmann 1984; González-García et al. 1996).

Insects of the family Alydidae are relatively small and are found in North America foliage and flowers (Froeschner 1988). The diploid chromosome number of this family is  $2n= 13$  ( $10A + 2m + X0$ ) (Ueshima 1979). All species of Alydidae that have been cytogenetically described to date possess m-chromosomes and a single X chromosome during male meiosis (Da Cunha Marques 1945; Manna 1951; Ueshima 1979), except for *Akbaratus fasciatus*  $X_1X_2Y$  (Paschal 1957 apud Sands 1982).

Insects of the family Coreidae are widely distributed, although they are most abundant and grow the largest in tropical and subtropical regions. Most Coreidae have peculiar appearances and are of significant economic importance (Schuh and Slater 1995). The sex chromosome system prevalent in Coreidae is  $X_0/XX$  (male/female), and a distinct cytogenetic feature in most species is the presence of a pair of m-chromosomes, which are achiasmatic, associate as a pseudobivalent in the centre of the metaphase I plate and present pre-reductional division (Wilson 1905; Bressa et al. 2001). In the Coreidae species described thus far, the diploid number of chromosomes varies from 13 ( $10A + 2m + X_0$ ) to 28 ( $24A + 2m + X_1X_2_0$ ), although most have 21 chromosomes (Ueshima 1979; Sands 1982; Manna 1984; Dey and Wangdi 1988; Satapathy and Patnaik 1989; Cattani and Papeschi 2004; Souza et al. 2007b).

The species of the family Corimelaenidae, treated by some authors as a subfamily of Cydnidae, represent approximately 200 species and nine genera distributed across the Western Hemisphere. They are small- to medium-sized, dark-coloured and develop a convex scutellum that covers most of the forewing with a yellowish exochorion (Grazia et al. 1999). Cytogenetic data are scarce for this family, except for the family Cydnidae, which generally presents a diploid number ranging from 12 to 14 autosomes + XY (Mikolajski 1968; Ueshima 1979).

The family Lygaeidae consists of several species that have been cytogenetically analyzed, with chromosome numbers ranging from 14 to 30, and 14 chromosomes is the modal number for the family. Most species present m-chromosomes and the XY sex chromosome system, although the  $X_1X_2Y$  complement does occur, albeit less frequently (Ueshima 1979).

Among Heteroptera, the family Reduviidae is distinguished for consisting of insectivorous, phytophagous and hematophagous insect species and is therefore of great importance for agricultural productivity and human health because members of this family can transmit Chagas disease during their feeding. Because they are larger in size than other bugs that act as predators, Reduviidae consume a higher number and also a broader spectrum of prey species (Panzer et al. 1992). The diploid chromosome number most commonly observed in Reduviidae is 24 ( $22A + XY$ ), and the most common sex chromosome system is the XY, although alternative chromosomal complements, such as  $X_1X_2Y$ ,  $X_1X_2X_3Y$  or  $X_1X_2X_3X_4Y$ ,

are also found in males. There are also reports of the presence of m-chromosomes (Ueshima 1979).

A notable cytogenetic aspect of the family Rhopalidae is that all species in this family that have been described in the literature have a chromosome complement of  $2n=13$  chromosomes, with ten autosomes, two m-chromosomes and one X sex chromosome (Ueshima 1979; Souza et al. 2009).

Scutelleridae comprise a small family of Heteroptera that used to be considered part of the Pentatomidae but now form a separate family. Insects in this family can vary in size from medium to large and are distributed worldwide, with 80 genera and 450 species. The most notable feature of these insects is their scutellum, which covers the entire abdomen, hides the wings and gives them the appearance of a beetle. These insects feed on grasses, herbs, fruits and flowers. The number of chromosomes in insects of this family varies from 12 to 14, with no m-chromosomes and the presence of the XY sex chromosome system (Papeschi and Bressa 2006).

Tingidae is a family composed of small insects (2-10 mm) with reticulated wing surfaces. These insects are often located on the abaxial surface of leaves, where they drink the sap and cause the yellowing and premature senescence of these leaves, resulting in great damage to plantations. Each individual completes its life cycle on the same plant and sometimes in the same general region of a plant. This family predominantly has six pairs of autosomes and the XY sex chromosome system; only one species with an X0 system has been reported (Nokkala and Nokkala 1984).

The suborder Heteroptera is extremely large, with over 40,000 described species, but this number is most likely higher because many others species are yet to be identified and described. Cytogenetic information is scarce and highly variable between species of this suborder, even at the family level, where this information is predominantly available only for the families Coreidae and Pentatomidae. In others families of this suborder, variations related to the chromosome complements, the sex chromosome systems used and the meiotic behaviour are poorly described. In this study, 18 Heteroptera species from eight different families were analyzed to broaden the cytogenetic information available for this suborder.



## MATERIAL AND METHODS

In this study were analyzed 18 species of terrestrial Heteroptera, belonging to eight families, as delineated in Table 1: Alydidae (*Neomegalotomus parvus* West. and *Stenocoris furcifera* West.), Coreidae (*Acanonicus hahni* Stål, *Acanthocephala* sp. and *Anisoscelis foliacea marginella* Dallas), Corimelaenidae (*Galgupha sidae* Amyot and Serville), Lygaeidae (*Oncopeltus fasciatus* Dallas, *Oxycarenus hyalinipennis* Costa and *Pachybrachius bilobatus* Say), Reduviidae (*Atopozelus opsimus* Elkins and *Doldina carinulata* Stål), Rhopalidae (*Harmostes serratus* Fabricius, *Harmostes apicatus* Stål, *Jadera haematoloma* Herrich-Schaffer, *Jadera sanguinolenta* Fabricius and *Jadera* sp.), Scutelleridae (*Pachycoris torridus* Scopoli) and Tingidae (*Dictyla monotropidia* Stål). The insects were fixed in methanol:acetic acid (3:1). Testicles from representative species for each family were extracted. Subsequently, the testicles of 10 adult males of each species collected in São José do Rio Preto (20°47'32" S, 49°21'37" W), São Paulo, Brazil were placed on slides and stained with orcein lacto-acetic for cytogenetic analysis. Representative images were captured under a ZEISS AXIO SCOPE A1 microscope using the Axio Vision LE (version 4.8) image analysis program.

## RESULTS

### Meiotic Behaviour

Cytogenetic analysis of prophase I cells showed varied numbers of heteropyknotic corpuscles. Therefore, the number of corpuscles observed depends on the sex chromosome system belonging to each species. For example, in the species *Neomegalotomus parvus*, which has the X0 sex chromosome system, was observed only a single, rounded corpuscle that was likely the X chromosome (Fig. 1a). It was identified one or two heteropyknotic corpuscles in XY chromosome systems, which are likely to be associated or separated sex chromosomes. For example, in *Oncopeltus fasciatus* (Fig. 1b) or in *Atopozelus opsimus*, in which X and Y chromosomes are close, was found a single corpuscle with two distinct regions (Fig. 1c), but it was observed two distinct corpuscles in *Galgupha sidae* (Fig. 1d). *Doldina carinulata* had a  $X_1X_2Y$  sex chromosome complement, and it was observed three well-separated heteropyknotic corpuscles (Fig. 1e). Heteropyknotic corpuscles were observed until the end of prophase I, as showed in *Harmostes serratus* (Fig. 1f).

In the species *Jadera sanguinolenta* and *Jadera* sp. belonging to the same family (Rhopalidae), were founded four heteropyknotic corpuscles: one more evident, one less evident and two minor (Fig. 1g, h). Similarly, it was observed another exception. In these species, the sex chromosome system was X0; in addition to having heteropyknotic sex chromosomes, they had highly condensed autosomes in early prophase I (Fig. 1h).

The chiasma were another characteristic observed in meiotic cells, which can be seen in mid prophase I in species such as *Neomegalotomus parvus* (Fig. 1i) and *Anisosceles foliacea marginella* (Fig. 1j). It was observed single or two, terminal or interstitial chiasma (Fig. 1k-m). Interstitial chiasma occurred at different distances along the entire chromosome and usually gave the chromosome a cross morphology (*N. parvus* and *A. Hahni*) (Fig. 1k, l). Chromosomes with two terminal chiasmata produced ring morphologies (*Oxycarenum hyalinipennis*) (Fig. 1m).

When chromosomes were condensed, they could be associated with telomeric regions (Fig. 2e). These associated chromosomes may form a group that remains until diplotene (Fig. 2a, b), when they begin to separate (Fig. 2c). This type of association was observed in *Doldina carinulata* (Fig. 2a-c) and *Stenocoris furcifera* (Fig. 2d). In other species, only some chromosomes are associated by their telomeres to the end of prophase, as observed in *Galgupha sidae* (Fig. 2e; f). In other species, the different chromosomes do not unite.

It is possible to identify the chromosome with its homologues, at the end of prophase I, including those associated by telomeric regions, as observed in *Jadera* sp. (Fig. 2g). The autosomal chromosomes were of similar size in all species, except in the species *Galgupha sidae* (Fig. 2f), *Jadera* sp. (Fig. 2g,i) and *Jadera haematoloma* (Fig. 2h), which contain one autosome that is much larger than the others. In addition, insects of the Genus *Jadera* possess one pair of autosomes that do not associate by their telomeres (Fig. 2h).

As previously mentioned, the sex chromosomes are usually heteropyknotic by the end of prophase I, making their identification relatively easy. Similarly, a pair of m-chromosomes could also be identified at this stage (Fig. 2j).

In early metaphase I, the autosomes begin to arrange in a circle (polar view), whereas the sex chromosomes and m-chromosomes are organised differently. The location of all

chromosomes depends on the sex chromosome system of each species and whether they have m-chromosomes. Therefore, if a species presented an X0 sex chromosome system but had no m-chromosomes, the X chromosome was found outside of the ring formed by the autosomes as in *Acanonicus hahni* (Fig. 2k). Conversely, if a species possessed an X0 sex chromosomes system and had m-chromosomes, the X chromosomes was observed outside the ring formed by the autosomes but the m-chromosomes were found inside the ring, forming a pseudobivalent (Fig. 2l, *Jadera* sp.). When species possessed XY sex chromosomes systems, both sex chromosomes remained at the centre of the ring (Fig. 2m, *Dictyla monotropidia*). Additionally, all of the species that presented X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosomes systems had their sex chromosomes located inside the autosomal ring as in *Oxycarenum hyalinipennis* (Fig. 2n).

Before homologous chromosomes begin to separate, they migrated at the central region of the cell (side view), and in some species were observed the sex chromosomes separated from the other chromosomes (Fig. 2o, *Jadera haematoloma*).

Another feature in the analyzed species was the lagging chromosome of the sex chromosomes during anaphase I and II. In the species that possess the X0 sex chromosome system, the late migration was observed in anaphase I when the two cells were being formed. Because these chromosomes in Heteroptera are divided equally in the first division, each of the two daughter cells receives a sex chromosome after the separation of sister chromatids. Therefore, in the second division, only one cell will receive the sex chromosome (Fig. 3a, *Acanonicus hahni*). This sex chromosome was observed as a heteropyknotic body until the end of anaphase I (Fig. 3b, *Jadera haematoloma*), and in some species (Fig. 3c, *Acanonicus hahni*), even into telophase II. However, *Galgupha sidae* displayed a different pattern because the sex chromosome appears heteropyknotic and a "filament" of chromatin migrated late (Fig. 3d).

Spermiogenesis was also analyzed in all 18 species, and it was observed vesicles next to the nucleus in the rounded morphology of all of the early spermatids in the early stages of spermiogenesis (Fig. 3e,f), except in the species *Jadera haematoloma* and *Oxycarenum hyalinipennis*, in which vesicles persisted along the entire stretch of the spermatid. *Jadera haematoloma* presented one large and several smaller vesicles during the elliptical stage (Fig. 3j). Only larger vesicles are observed in a more developed stage of the spermatid (Fig. 3k). *Oxycarenum hyalinipennis* spermatids contained several small vesicles during the differentiation stage (Fig. 3l).

In early spermatids, chromatin was either distributed uniformly throughout the nucleus (Fig. 3h,i) or located near the nuclear envelope and inside the nucleus (Fig. 3g). The elongation of the spermatid was generally similar in all species. Spermatids had a small head and long tail and were straight (Fig. 3m,p), with few exceptions, such as *Oncopeltus fasciatus*, which had spermatids with spiral tails (Fig. 3n,o). It was also observed that the cells in *Galgupha sidae* were much larger than in others examined species (Fig. 3d).

### Chromosome Complement

The chromosome complements of meiotic cells were examined (Fig. 4a-r). Although species of the family Alydidae all have the same chromosome complement ( $2n=13$ ), *Neomegalotomus parvus* (Fig. 4a) has m-chromosomes and *Stenocoris furcifera* does not possess m-chromosomes (Fig. 4b). Nearly all analyzed species of the family Coreidae possessed the X0 sex chromosome system, with 18 autosomes (except for *Anisoscelis foliacea marginella*, which possessed 24 - Fig. 4e) and m-chromosomes, as seen in *Acantocephala* (Fig. 4d), but not in *Acanonicus hahni* (Fig. 4c).

The family Rhopalidae was the only family examined in which all of the species have the same chromosome complement of  $2n=13$  chromosomes ( $10A + 2m + X0$ ) (Fig. 4l-p). *Galgupha sidae* (Corimelanidae, Fig. 4f) and *Pachycoris torridus* (Scutellerridae, Fig. 4i) have the same chromosome complement, despite belonging to different families ( $10A + XY$ ). *Dictyla monotropidia* (Tingidae, Fig. 4r) exhibited a chromosome complement of  $2n=14$  ( $12A + XY$ ). Regarding the Reduviidae family, it was observed two X chromosomes in the species *Doldina carinulata*, which possessed a chromosome complement of  $2n=27$  ( $24A + X_1X_2Y$ ) (Fig. 4k). This species differed from *Atopozelus opsinus* (Reduviidae) by presenting a chromosome complement of  $2n=26$  ( $24A + XY$ ). The highest diversity of chromosome complements was observed in the species of the family Lygaeidae:  $2n=18$  ( $16A + XY$ ) (*Oncopeltus fasciatus*, Fig. 4g),  $2n=17$  ( $14A + X_1X_2Y$ ) (*Oxycarenum hyalinipennis*, Fig. 4h) and  $2n=16$  ( $12A + 2m + XY$ ) (*Pachybrachius bilobatus*, Fig. 4q) (Table 1).

### DISCUSSION

The ancestral number of chromosomes in heteropterans is an evolutionary characteristic that is difficult to establish because of their holokinetic characteristics. This way it is possible to occur fragmentations or fusions (Ueshima and Ashlock 1980; Jacobs 2004). In the species analyzed in this paper, the only family in which all species have the same chromosome complement was Rhopalidae,  $2n= 13$  ( $10A + 2m + X0$ ). The Alydidae species had the same number of chromosomes,  $2n= 13$ , but the distribution of chromosomes was different, with some possessing a  $10A + 2m + X0$  complement and others a  $12A + X0$  chromosome complement. Other families (Coreidae, Lygaeidae and Reduviidae) for which were analyzed more than one species had chromosome complements that differed between species of the same family. Among the three families investigated, only in Coreidae did all species have the same sex chromosome system ( $X0$ ), whereas Lygaeidae and Reduviidae presented  $X_1X_2Y$  and  $XY$ , and Corimelaenidae, Scutelleridae and Tingidae had the  $XY$  system. Even the presence or absence of m-chromosomes depends on the family; Alydidae, Coreidae and Lygaeidae contained some species with and some without these chromosomes, demonstrating the karyotypic diversity in families of Heteroptera. However, the analysis of species conducted in this work and the analyses previously described in the literature did not reveal a clear pattern for the number of chromosomes for each family, whereas the sex chromosome system appears to be more common in every family. Based on the number of chromosomes (13), the  $X0$  sex chromosome system and the presence of m-chromosomes, this study suggests that the families Alydidae and Rhopalidae are evolutionarily close. Similarly, Corimelaenidae and Scutelleridae demonstrate similar chromosome complements, identical sex chromosome systems and contain no m-chromosomes.

Previously published data (Ueshima 1979; Souza et al. 2009), which observed that all species of Rhopalidae had 13 chromosomes, with ten autosomes, two m-chromosomes and one sex chromosome, was consistent with our data, and we can thus reaffirm that the species in this family have conserved chromosome complements. According to these studies, most species of the family Alydidae also possess the same chromosome complement, with the exception of approximately 23% of the species that have 14 or 17 chromosomes. Our analysis of Alydidae species is consistent with these results, and it can be suggested that these families are evolutionarily close. It was also verified that *Stenocoris furcifera* is the only species belonging to the family Alydidae that has no m-chromosomes between the analyzed species.

Species that belong to the family Coreidae have extremely variable chromosome numbers, ranging from 13 to 28 chromosomes. Most species in this family, however, have 21 chromosomes (Ueshima 1979; Sands 1982; Manna 1984; Dey and Wangdi 1988; Satapathy and Patnaik 1989; Cattani and Papeschi 2004; Souza et al. 2007b, 2009). Our results confirm these data because it was verified different chromosome complements in the three analyzed species from Coreidae. Another characteristic previously observed for the species of this family is that most have m-chromosomes and the X0 sex chromosome system, a characteristic that is also observed in the species examined in this work, except for *Acanonicus hahni*, which had no m-chromosomes. Because most species analyzed have m-chromosomes and an X0 sex chromosome system, it can be inferred that the families Alydidae, Coreidae and Rhopalidae are evolutionarily close.

Most insects examined in the family Lygaeidae present m-chromosomes and the XY sex chromosome system (Ueshima 1979; Souza et al. 2007c). According to Ueshima (1979), *Oncopeltus fasciatus* has chromosome complement 14A + XY; however, the species analyzed in this study had 16A + XY. *Oxycarenus hyalinipennis* and *Pachybrachius bilobatus* showed the same chromosome complement described by Ueshima (1979). Therefore, more specimens of *Oncopeltus fasciatus* belonging to other geographical locales should be examined to verify whether this is an intrapopulation difference.

The chromosome complements of species of the family Reduviidae, Scutelleridae and Tingidae described in this study are consistent with those described in the literature. Because of the small number of species analyzed from the family Corimelaenidae, further studies will be required to conclusively predict the pattern of chromosome complements in this family.

Information on the evolution of these chromosomes is scarce in existing literature because of the lack of distinct centromere morphology and the ability to longitudinally differentiate chromosomes to detect structural variation. For these reasons, chromosomal rearrangements, such as inversions and reciprocal translocations, are rarely reported in these organisms, further preventing specific conclusions. Therefore, a larger number of species should be evaluated using other techniques to better understand the evolution of chromosomes in these species.

Although m-chromosomes present differentiated behaviours, their functions and origin have not yet been established. Our analyses showed that the species *N. parvus* possess  $10A + 2m + X0$ , whereas *S. furcifera* were  $12A + X0$ . However, *P. bilobatus* (Lygaeidae) can also use as an example, which has  $12A + 2m + XY$ , and the modal chromosome number for this family is  $14A + XY$ . These characteristics must be explored by other approaches to establish the function and origin of the m-chromosome.

The presence of heteropycnotic corpuscles during prophase I, terminal or interstitial chiasmata, telomeric associations between chromosomes, ring disposal of autosomes during metaphase, late migration of the sex chromosome during anaphase, a reductional first meiotic division and an equational second meiotic division for autosomes and the sex chromosomes of the opposite sex, does not produce a distinguishing feature to identify species because all of the species analyzed in this study exhibit the same pattern as other species previously described in the literature (Ueshima 1979; Papeschi and Bidau 1985; Bressa et al. 2002; Castanhole et al. 2010; Costa et al. 2008; Souza et al. 2007b, 2009, 2010, 2011). The larger chromosomes observed in *Galgupha sidae* and *Jadera* sp. may have originated recently, as they are present in karyotypes with the lowest number of chromosomes.

The location of sex chromosomes during metaphase I is related to specific families or to the presence or absence of m-chromosomes. Hence, for example, if a species is  $X0$ , the X chromosome lies outside the ring formed by the autosomes. However, if the species has m-chromosomes, the X chromosome still lies outside the ring and the m-chromosome lies inside the ring. When species are XY or  $X_1X_2Y$ , all sex chromosomes remain at the centre of the ring formed by the autosomes. These features have also been observed by Ueshima (1979) and Souza et al. (2007a, 2007b, 2007c, 2008, 2010, 2011).

Information regarding spermiogenesis in Heteroptera remains extremely rare. It is known that early spermatids, which are round, contain vesicles of varying sizes and uncertain function, with larger vesicles present in some species (Castanhole et al. 2010). During elongation, the spermatid may attain an elliptical morphology, as observed in terrestrial Heteroptera (Souza and Itoyama 2011), or a rod-like shape, usually observed in aquatic species (Castanhole et al. 2008, 2010). The species investigated in this study had all of the features described above, indicating that these features are similar between species.

The Heteroptera, therefore, are suitable insects for the analysis of meiosis because they have many characteristics that can be examined (presence or absence of m-chromosomes, different sex chromosome systems, different chromosomal complements) and still more questions (Which of these characteristics are ancestral? What is the content of vesicles of spermatids?) that continue to intrigue us and need further research to be answered. Thus, this study extends the knowledge of these characteristics and collaborates to solve those questions.

### **Acknowledgements**

This work was financially supported by FAPESP, CAPES, CNPq and FUNDUNESP. Prof. Antonio Luis Alves Costa, University of Rio de Janeiro, RJ, Prof. Jose Antonio Fernandez Marin Federal University of Pará, and Prof. PA. Helcio Dr. Gil Santana do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro assisted in the identification of insects.

### **REFERENCES**

- Bressa MJ, Papeschi AG, Larramendy ML. 2001. Meiotic studies in *Largaesus alboornatus* Blanchard (Heteroptera, Lygaeidae: Lygaeinae). *Caryologia* 55: 15-19.
- Bressa MJ, Fumagalli E, Ituarte S, Frassa MV, Larramendy ML. 2002. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence on variations of the diffuse stage between wild and laboratory-inbred populations of *Dysdercus chaquency* Freiberg, 1948. *Hereditas* 137: 125-131.
- Castanhole MMU, Pereira LLV, Souza HV, Bicudo HEMC, Costa LAA, Itoyama MM. 2008. 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. *Genetics and Molecular Research* 7(4): 1398-1407.
- Castanhole MMU, Pereira LLV, Souza HV, Itoyama MM. 2010. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). *Genetics and Molecular Research* 9(3): 1343-1356.
- Cattani MV, Papeschi AG. 2004. Nucleolus organizing regions and semipersistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). *Hereditas* 140: 105-111.
- Costa LC, Azeredo-Oliveira MTV, Tartarotti E. 2008. Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). *Genetics and Molecular Biology* 31(2): 438.



- Da Cunha Marques AX. 1945. Cariologia comparada de alguns Hemípteros Heterópteros (Pentatomídeos e coreídeos). *Memorias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra*, 163: 1-116.
- Dey SK, Wangdi T. 1998. Chromosome number and sex chromosome system in forty-four species of Heteroptera. *Chromosome Information Service* 45: 5-8.
- Froeschner RC. 1988. *Family Alydidae Amyot and Serville, 1843*. Pp. 4-11 in T. J. Henry and R.C. Froeschner [eds.], *Catalog of the Heteroptera, or True Bugs, of Canada and the Continental United States*. E. J. Brill, London, U.K. 658 pp.
- Grazia J, Fortes NDF, Campos LA. 1999. *Pentatomoidea*. In: Joly, CA, Bicudo CEM. orgs. *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*, 5: invertebrados terrestres. São Paulo 5: 101-11.
- Gonzalez-Garcia JM, Antonio C, Suja JA, Rufas JS. 1996. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research* 4: 124-132.
- Gullan PJ, Cranston OS. 2008. *Os insetos: um resumo de entomologia* (3rd ed.), Roca, São Paulo.
- Jacobs DH. 2004. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae: Carventinae). *Chromosome Research* 12: 175-191.
- Liang AP, Webb MD. 2002. New taxa and revisionary notes in Rhinaulacini spittle bugs from southern Asia (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Natural History* 36: 729-756.
- Manna GK. 1951. A study of chromosomes during meiosis in forty-three species of Indian Heteroptera. *Proceedings of the Zoological Society of Bengal* 4: 1-116.
- Manna GK. 1984. *Chromosomes in evolution in Heteroptera* In: SHARMA, AK. ed. *Chromosomes in evolution of Eukaryotic groups*. Boca Raton Florida USA: CRPress, p. 189-225.
- Mikolajski M. 1968. Chromosome numbers in five species of Pentatomidae Reut (Hemiptera - Heteroptera). *Experientia* 24(10): 1062-1063.
- Miller LT. 2004. *Lace bugs (Hemiptera: Tingidae)*. In: *Encyclopedia of Entomology* (JL. Capinera, editor). 2: 1238-1241.
- Motzko D, Ruthmann A. 1984. 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* 33: 205-216.
- Nokkala S, Nokkala C. 1984. The occurrence of the X0 sex chromosome system in *Dictyonota tricornis* (Schr.) (Tingidae, Hemiptera and its significance for concepts of sex chromosome system evolution in Heteroptera. *Hereditas* 100: 299-301.

- Panzer F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Perez R, Suja JA, Scovortzoff E, Dujardin JP, Estramil E, Salvatillar RC. 1992. Heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera – Reduviidae). *Genome* 35: 1068-1074.
- Papeschi AG, Bidau CJ. 1985. Chromosome complement and male meiosis in four species of *Belastoma Latreille* (Heteroptera-Belostomatidae). *Revista Brasileira de Genética VIII* 2: 249-261.
- Papeschi AG, Bressa MJ. 2006. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *Journal of Biological Research* 5: 3-21.
- Sands, VE. 1982. Cytological studies of the Coreidae and Alydidae (Hemiptera: Heteroptera). II. Karyological changes exemplified by Malaysian genera. *Caryologia* 35: 333-345.
- Satapathy SN, Patnaik SC. 1989. Chromosome numbers in forty-one species of Indian Heteroptera. *Chromosome Information Service* 47: 3-5.
- Schuh TT, Slater JA. 1995. *The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): Classification and natural history*, Cornell UNIVERSITY press, 1995.
- Souza HV, Bicudo HEMC, Costa LAA, Itoyama MM. 2007a. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). *European Journal of Entomology* 104: 353-262.
- Souza HV, Arakaki RLM, Dias LN, Murakami AS, Costa LAA, Bicudo HEMC, Itoyama MM. 2007b. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). *Cytologia* 72: 49-56.
- Souza HV, Bicudo HEMC, Itoyama MM. 2007c. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Genetics and Molecular Research* 6: 33-40.
- Souza HV, Castanhole MMU, Bicudo HEMC, Costa LAA, Itoyama MM. 2008. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). *Genetics and Molecular Biology* 31: 686-691.
- Souza HV, Souza FB, Maruyama SRC, Castanhole MMU, Itoyama MM. 2009. Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. *Genetics and Molecular Research* 8(4): 1383-1396.
- Souza HV, Itoyama MM. 2010. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche: A Journal of Entomology* 2010: 10.
- Souza HV, Itoyama MM. 2011. Comparative analysis of heteropycnotic chromatin and silver-stained material in *Platycarenum umbratulatus* (Pentatomidae: Discocephalinae). *Invertebrate Reproduction & Development* 55(2): 65–72.

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

Ueshima N., Ashlock P.D. 1980. Cytotaxonomy of the Lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera). *University of Kansas Science Bulletin* 51(26): 717-801.

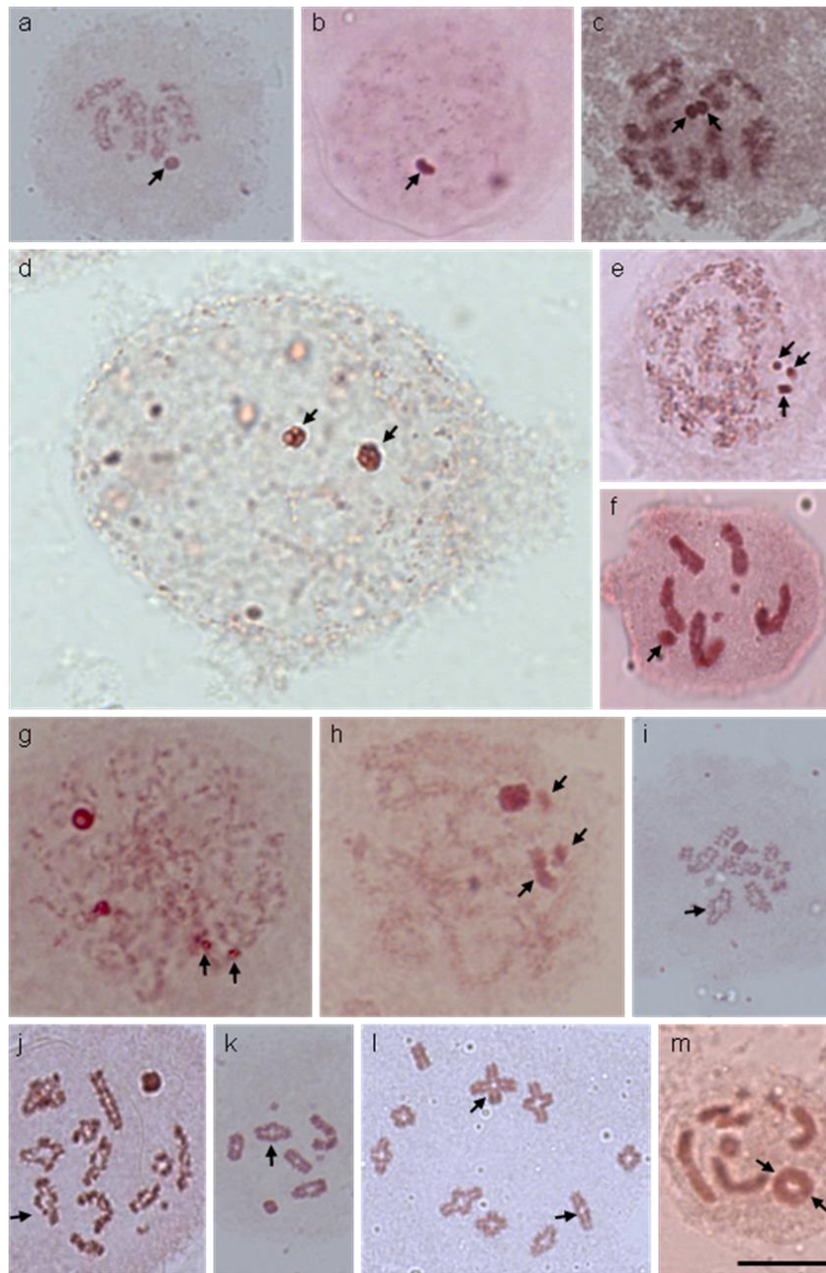
Wilson, EB. 1905. The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. *Science* 22: 500-502.

Wolf KW. 1996. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin in male meiotic spindles of *Pyrrhocoris apterus*, an insect with holocentric chromosomes. *Protoplasma* 191: 148-157.

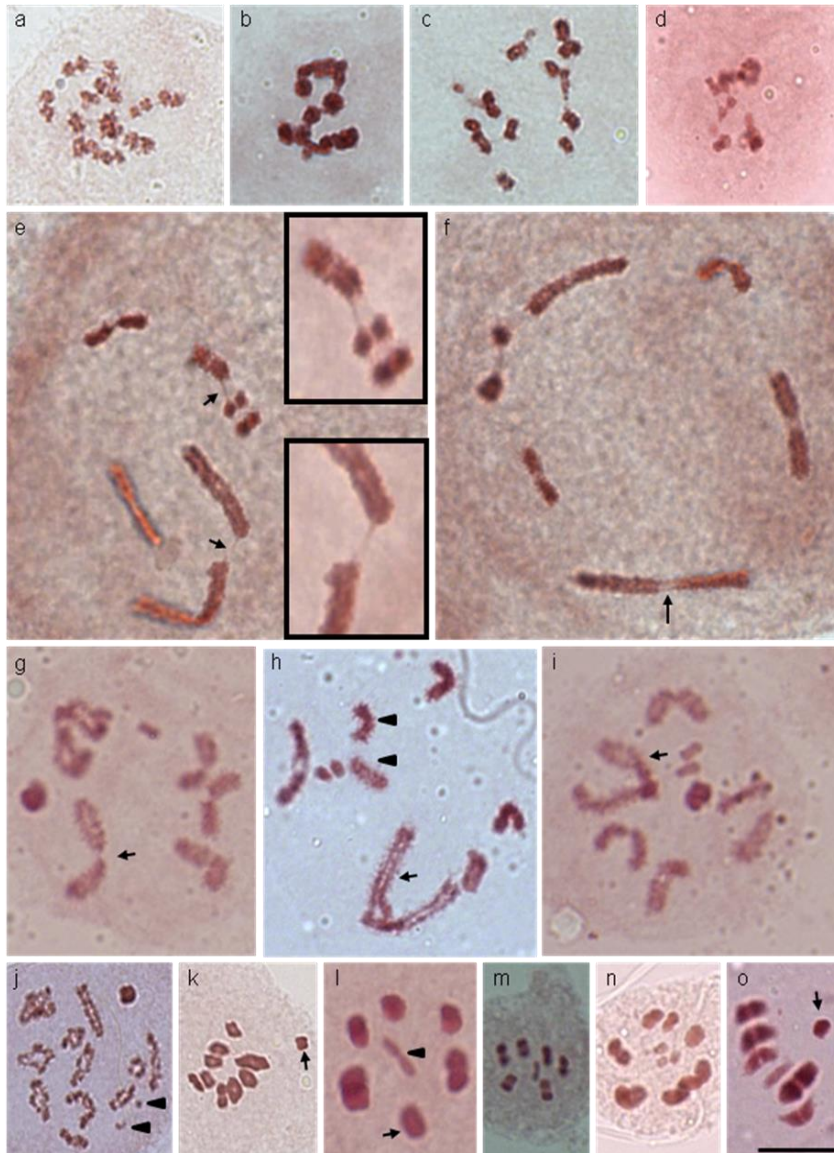
## Figures and tables legends

**Table 1.** Classification and chromosomal complements of 18 species of Heteroptera.

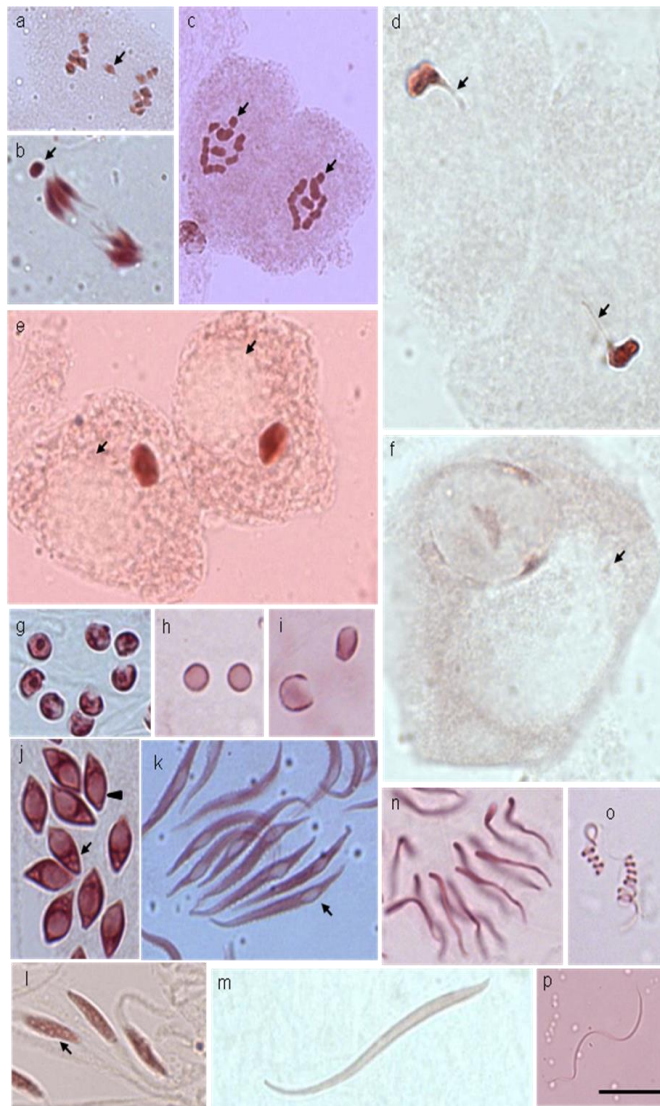
<b>Family</b>	<b>Specie</b>	<b>Chromosomal Complement</b>
Alydidae	<i>Neomegalotomus parvus</i>	13 (10A + 2m + X0)
	<i>Stenocoris furcifera</i>	13 (12A + X0)
Coreidae	<i>Acanonicus hahni</i>	19 (18A + X0)
	<i>Acantocephala</i> sp.	21 (18A + 2m + X0)
	<i>Anisoscelis foliacea marginella</i>	27 (24A + 2m + X0)
Corimelaenidae	<i>Galgupha sidae</i>	12 (10A + XY)
Lygaeidae	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	18 (16A + XY)
	<i>Oxycarenus hyalinipennis</i>	17 (14A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)
	<i>Pachybrachius bilobatus</i>	16 (12A + 2m + XY)
Reduviidae	<i>Atopozelus opsinus</i>	26 (24A + XY)
	<i>Doldina carinulata</i>	27 (24A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)
Rhopalidae	<i>Harmostes apicatus</i>	13 (10A + 2m + X0)
	<i>Harmostes serratus</i>	13 (10A + 2m + X0)
	<i>Jadera haematoloma</i>	13 (10A + 2m + X0)
	<i>Jadera sanguinolenta</i>	13 (10A + 2m + X0)
	<i>Jadera</i> sp.	13 (10A + 2m + X0)
Scutelleridae	<i>Pachycoris torridus</i>	12 (10A + XY)
Tingidae	<i>Dictyla monotropidia</i>	14 (12A + XY)



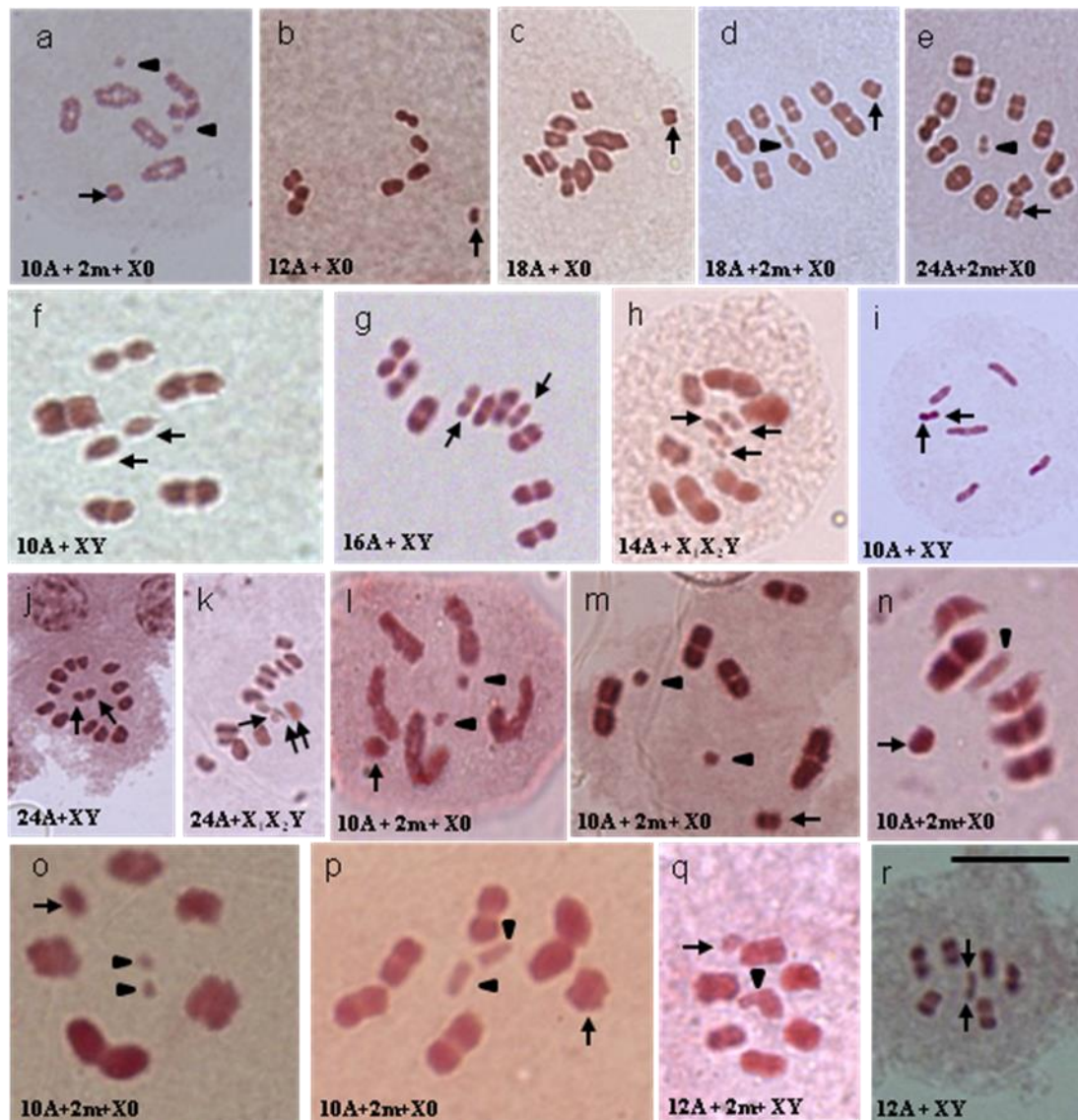
**Figure 1.** Spermatogonial cells of *Neomegalotomus parvus* (a, i, k), *Oncopeltus fasciatus* (b), *Atopozelus opsimus* (c), *Galgupha sidae* (d), *Doldina carinulata* (e), *Harmostes serratus* (f), *Jadera sanguinolenta* (g), *Jadera* sp. (h), *Anisosceles foliacea marginella* (j), *Acanonicus hahni* (l) and *Oxycarenum hyalinipennis* (m) stained with lacto-acetic orcein. a-e) Initial prophase showing an intensely stained, rounded heteropycnotic corpuscle (arrow in a), two closely associated corpuscles (arrow in b), less associated corpuscle (arrows in c); completely separate corpuscles (arrows in d), or three completely separate corpuscles (arrows in e); f-j) the final stage of prophase, with persistent heteropycnotic corpuscles that are possibly the sex chromosomes (arrowhead in f and h). Other heteropycnotic chromosomal regions observed (arrows in g and h); i-m) diplotene / diakinesis showing interstitial (arrows in i-l), or terminal (arrows in m) chiasmata. Bar: 10  $\mu$ m



**Figure 2.** Spermatogonial cells of *Doldina carinulata* (a-c), *Stenocoris furcifera* (d), *Galgupha sidae* (e, f), *Jadera* sp. (g, i, l), *Jadera haematoloma* (h, o), *Anisosceles foliacea marginella* (j), *Acanioniscus hahni* (k), *Dictyla monotripidia* (m), *Oxycarenum hyalinipennis* (n) stained with lacto-acetic orcein. a-d) Chromosomes associating at their telomeres; they appear Z-shaped in (b); e-f) telomeric association of a few chromosomes (arrows in e and inset); g) association of telomeres between autosomes (arrow); h) autosomes associated at non-telomeric regions (arrowheads). Notice the differentiated size of autosomes (f-i, arrows); j) presence of m-chromosomes (arrowheads); k) The circular arrangement of autosomes and a sex chromosome out of the ring (arrow show the X chromosome); l) autosomes arranged in a circle, with the X chromosome inside the ring (arrow) and the m-chromosomes in the centre of the ring (arrowhead); m, n) sex chromosomes in the centre of the autosomal ring, X and Y (m) and  $X_1X_2Y$  (n); o) metaphase in a side view, with the heteropycnotic sex chromosome (arrow). Bar: 10  $\mu$ m



**Figure 3.** Spermatogonial cells of *Acanionicus hahni* (a, c), *Jadera haematoloma* (b, g, j, k, p), *Galgupha sidae* (d, f, m), *Pachybrachius bilobatus* (e), *Oxycareus hyalinipennis* (l), *Oncopeltus fasciatus* (h, i, n, o) stained with lacto-acetic orcein. a, b) Anaphase I with lagging chromosome of the sex chromosome (a, arrow). Note that this chromosome remains heteropycnotic until the end of anaphase (b, arrow), c) telophase II with a regular division, showing the heteropycnotic corpuscles (arrows); d) material chromatin with late migration (arrows); e,f) round spermatid with heteropycnotic material and a large vesicle (arrows); g) round spermatid with chromatin around the nuclear envelope and inside the nucleus; h,i) round spermatids with chromatin evenly distributed throughout the matrix and around the nuclear envelope; j) elliptical spermatids presenting a larger vesicle (arrowhead) and several smaller vesicles (arrow); k) spermatids being elongated with a single vesicle (arrow); l) several small vesicles during differentiation (arrow); m-p) spermatid in elongation, with coiled tail (n,o) and small head and long tail (p). Bar: 10  $\mu$ m



**Figure 4.** Metaphase cells of *Neomegalotomus parvus* (a), *Stenocoris (Oryzocoris) furcifera* (b), *Acanonicus hahni* (c), *Acantocephala* sp. (d), *Anisoscelis foliacea marginella* (e), *Galgupha sidae* (f), *Oncopletus fasciatus* (g), *Oxycareus hyalinipennis* (h), *Pachycoris torridus* (i), *Atopozelus opsinus* (j), *Doldina carinulata* (k), *Harmostes apicatus* (l), *Harmostes serratus* (m), *Jadera haematoloma* (n), *Jadera sanguinolenta* (o), *Jadera* sp. (p), *Pachybrachius bilobatus* (q) and *Dictyla monotropidia* (r) stained with lacto-acetic orcein. Asterisks indicate the X chromosomes, Arrows show the Y and the arrowhead indicates m-chromosomes. Bar: 10  $\mu$ m



## DISCUSSÃO GERAL

Estudos de sistemática filogenética tem como objetivo estabelecer um sistema de classificação biológica baseado na relação de parentesco entre os organismos e expressar esses resultados de uma forma clara e acessível, portanto devem ser estáveis e fornecerem condições para previsão da distribuição de caracteres ainda não estudados e reunir a maior quantidade de informações possíveis a respeito dos grupos a que se referem (SCHUH, 1986; HENNING, 1968, AMORIM 2002, SCHUH; BROWER, 2009).

Com o avanço das ferramentas moleculares houve grande acesso a uma vasta quantidade de caracteres, entretanto, diversos estudos têm evidenciado que as hipóteses de relações filogenéticas mais robustas e bem fundamentadas são aquelas produzidas com o uso de todas as informações disponíveis (KLUGE, 1989; ERNISSE; KLUGE, 1993; KLUGE; WOLF, 1993; WHITING et al. 1997, KLUGE, 1998; MURRELL et al., 2001; KLUGE, 2004; MISHLER, 2005; GRAZIA, 2008).

Os problemas de classificação em todos os níveis podem ser devidos a grande diversidade dos táxons, falta de catálogos modernos e falta de integração entre os trabalhos de diferentes regiões do mundo (SCHUH, 1986; GAPUD, 1991; GRAZIA, 2008).

Neste estudo analisamos 25 espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a fim de analisar suas relações filogenéticas baseadas nas sequências de genes mitocondriais (*Cytb*, *COI* e *16S*) e nucleares (*18S* e *28S*) de maneira individual ou concatenada e dados morfológicos e citogenéticos (cor da bainha peritoneal, número de lobos e complemento cromossômico), já que descrições na literatura sobre as relações filogenéticas entre as famílias e as tribos, do presente estudo, ainda, são escassas.

Em nossos estudos, observamos a formação de um clado de cada família mostrando que as análises foram eficazes para a separação das espécies neste nível, observamos, também, que esses clados formam grupo-irmão.

Analisando a família Coreidae observamos na maioria das análises, que formam agrupamentos monofiléticos, como já relatado em estudos anteriores (LI et al., 1996). Quanto à família Pentatomidae nossos estudos confirmaram sua monofilia já demonstrada por outros autores (GAPUD, 1991; HASAN; KITVHING, 1993; GRAZIA et al., 2008).

Em relação às tribos observamos o agrupamento constante de espécies da mesma tribo, como, por exemplo, os formados pelas espécies da tribo Carpocorini (*M. v-luteum*, *E. heros* e *Oebalus* sp) e Discocephalini (*A. tripterus* e *P. umbraculatus*). Além dos

agrupamentos congêneros das espécies de *Dallacoris* (Coreidae) e *Oebalus* (Pentatomidae), que se agruparam na maioria das análises com altos valores de *bootstrap*.

No entanto, agrupamentos entre espécies de mesma família, porém de tribos diferentes ainda merecem ser mais bem estudados e explorados como, por exemplo, de *A. bellator* (Coreini) e *A. foliacea* (Anisoscelidini) (Coreidae), as relações entre as espécies de *Dallacoris* (Leptoscelini) e *Leptoglossus* (Anisoscelidini) (Coreidae), *P. albopunctulatus* (Pentatomini) e *P. guildinii* (Piezodorini) (Pentatomidae) e, *D. melacanthus* (Carpocorini) e *L. deducta* (Chlorocorini) (Pentatomidae), para que assim possam ser melhores entendidas.

Para a melhor resolução de dados foram então inseridos, nas análises, dados morfológicos e citogenéticos para observação e comparação dos resultados com a filogenia já existente de dados moleculares. Com o conjunto de dados combinados observamos uma resolução melhor em relação, principalmente, às tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carpocorini (Pentatomidae), sendo que, nesta última houve a formação de um clado.

E, a fim de entendermos alguns agrupamentos, foi realizada então, uma análise evolutiva feita a partir das características morfológicas e citogenéticas que foi observado que algumas espécies agrupadas a partir dos dados moleculares possuem características morfológicas mais semelhantes com espécies de outras tribos do que com seu grupo.

Essa relação pode ser observada na tribo Anisoscelidini (Coreidae) onde as espécies (*A. foliacea*, *L. gonagra* e *L. zonatus*) não se agruparam a partir dos dados moleculares, porém, foi observado que possuem diferenças nas cores de bainha peritoneal e complementos cromossômicos. Foi observado também, que as espécies pertencentes a tribos diferentes agrupadas possuem características morfológicas e citogenéticas comuns como as espécies de *Leptoglossus* que se agrupam com as espécies de *Dallacoris* (Leptocelini) e que possuem coloração de bainha peritoneal vermelha e complemento cromossômico  $2n=21$ . E, entre as espécies de Pentatomidae *P. albopunctulatus* (Pentatomini) e *P. guildinii* (Piezodorini) que apesar de não serem da mesma tribo possuem o mesmo número de lobos testiculares (6).

Outro exemplo a ser citado diz respeito à espécie *Zicca annulata* (Coreidae) que está externamente a sua tribo em vários agrupamentos, porém, observamos que esta espécie possui peculiaridades que a diferem de seu grupo como, por exemplo, bainha peritoneal amarela, 4 lobos testiculares e complemento cromossômico  $2n=23$

Com esta análise foi possível identificar as relações entre as famílias, tribos e gêneros e algumas semelhanças entre as espécies de diferentes tribos agrupadas, porém, há

necessidade de um maior número de caracteres envolvidos, pois ainda existem muitas características que ainda não foram exploradas.

Uma filogenia robusta necessita de fatores como: catálogos recentes, estudos rigorosos, metodologia cladística atualizada e descrição precisa de caracteres (GRAZIA, 2008) e no grupo dos Heteroptera esses fatores ainda estão pouco notáveis. Assim, alguns agrupamentos puderam ser entendidos observando suas características morfológicas, porém esse conjunto de dados ainda é reduzido.

## CONCLUSÕES GERAIS

A partir das análises moleculares e morfológicas dos Heteroptera das famílias Coreidae e Pentatomidae foi possível identificar algumas relações entre as famílias, tribos e gêneros, demonstrando a eficiência dos genes, modelos biológicos e metodologias escolhidas. Assim podemos concluir que:

- houve a formação de um clado para cada família (Coreidae e Pentatomidae) e esses formaram grupo-irmão;
- na família Coreidae, na maioria das análises, houve formação de agrupamentos monofiléticos. Quanto à família Pentatomidae todas as análises confirmaram sua monofilia;
- espécies da mesma tribo se agrupam, como, por exemplo, os formados pelas espécies da tribo Carpocorini (*M. v-luteum*, *E. heros* e *Oebalus* sp) e Discocephalini (*A. tripterus* e *P. umbraculatus*);
- os agrupamentos congêneros das espécies de *Dallacoris* (Coreidae) e *Oebalus* (Pentatomidae), possuem altos valores de *bootstrap*;
- agrupamentos entre espécies de mesma família, porém de tribos diferentes ainda merecem ser melhores estudados e explorados como, por exemplo, de *A. bellator* (Coreini) e *A. foliacea* (Anisoscelidini) (Coreidae), as relações entre as espécies de *Dallacoris* (Leptoscelini) e *Leptoglossus* (Anisoscelidini) (Coreidae), *P. albopunctulatus* (Pentatomini) e *P. guildinii* (Piezodorini) (Pentatomidae) e, *D. melacanthus* (Carpocorini) e *L. deducta* (Chlorocorini) (Pentatomidae), para que assim possam ser melhor entendidos;
- a inserção de dados morfológicos e citogenéticos melhora a resolução dos resultados, principalmente, entre as tribos Pentatomini, Chlorocorini e Carpocorini (Pentatomidae), sendo que, nesta última houve a formação de um clado;
- espécies agrupadas, mesmo que de tribos diferentes, possuem características morfológicas semelhantes;
- é necessária a exploração desse complexo cenário evolutivo que envolve essas características com novas abordagens, como a utilização de outros caracteres morfológicos ou outros marcadores moleculares.

## REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An Acad Bras Ciênc**, v. 77, p. 437-454, 2005.
- GARCIA, B.A.; POWELL, J.R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **J Med Entomol**, v. 35, p. 232-238, 1998.
- AMORIM, D.S. Fundamentos de Sistemática Filogenética. **Holos Editora**, Ribeirão Preto, 1ªEd, 154p., 2002.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINUTOSGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann Rev in Ecol Syst**, v.18, p.489-522, 1987.
- BUCK, R.C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. **J Ultr Res**, v. 18, p.489-501, 1967.
- BUDOWLE, B.; ALLARD, M.W.; WILSON, M.R.; CHAKRABORTY, R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates and foundations. **Ann Rev of Geno and Hum Gen**, v.4, p.119-141, 2003.
- CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; BICUDO, H.E.M.C.; COSTA, L.A.A.; ITOYAMA, M.M. 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. **Gen and Mol Res**, v.7, n.4, p. 1398-1407, 2008.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Tr in Gen** v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003
- 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; URBAN, J.M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? **Syst Entomo**, v. 37, p. 7-21, 2012
- ERNISSE, D.J.; KLUGE, A.G. Taxonomic Congruence versus total evidence, and Amniote phylogeny inferred from fossil, molecules, and morphology. **Mol. Biol and Evol**, v.10, p 1170-1195, 1993.
- GAPUD, V.P. A generic revision of the subfamily Asopinae, with consideration on its phylogenetic position in the family Pentatomidae and superfamily Pentatomoidea (Hemiptera-Heteroptera). **Philip Entomol**. v. 8, p. 865-961, 1991
- 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). **Chr Res**, v. 4, p. 124-132, 1996.

GRAZIA, J.; SCHUH, R.T.; WHEELER, W.C. Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). **Cladistics**, v. 24, p. 932-976, 2008.

GRAZIA, J.; FORTES, N.D.F.; CAMPOS, L.A. Pentatomoidea. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, 5: invertebrados terrestres. p.101-112. São Paulo: FAPESP, 1999.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species de Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). **Folia Biologica** (Kraków), v. 49, n. 1-2, p. 29-41, 2001.

HASAN, S.A.; KITCHING, I.J. A cladistic analysis of the tribes of the Pentatomidae (Heteroptera). **Japan Jour Entomol.** v. 61, p. 651-669, 1993.

HENNIG, W. **Elementos de uma sistemática filogenética**, Ed Universitária, Buenos Aires, p.353, 1986.

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.

JOHN, B.; KING, M. Pseudoterminalization, terminalization and non-chiasmate modes of terminal association. **Chromosoma**, v. 92, p. 89-99, 1985.

JONES, G.H. Chiasmata. In: Monees PB, ed, **Meiosis**. Orlando: Academic Press, p. 213-244, 1987.

KLUGE, A.G. On total evidence from the record. **Cladistics** v. 20, p.205-207 , 2004.

KLUGE, A.G. Total evidence on taxonomic Congruence: Cladistics or Consensus Classification. **Cladistics**, v.14, p.151-158 , 1998.

KLUGE, A.G. Cladistics- What's in a word. **Cladistics**. v.9, p183-199, 1993.

KLUGE, A.G. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). **Syst. Zoo.** v.38, p7-25, 1989.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher level phylogeny and the first divergence time estimation of Heteroptera (Insect: Hemiptera) based on multiple genes. **Plos one**, v 7, v. 2: e32152. doi:10.1371/journal.pone.0032152,2012.

LI, X.Z. Cladistic analysis and higher classification of Coreoidea (Heteroptera). **Entomol Sinaca**. v. 3, p. 283-292, 1996.

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.

MAHNER, M. Systema Cryptoceratoum Phylogenetikum (Insect: Heteroptera). **Zoo Scripta**, v.48, p.1-302, 1993.

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

MISHLER, B.D. Logic of the data matrix in phylogenetic analysis In: Albert, V.A. (ED) Parsimony, Phylogeny and genomics. **Oxford Univ Press**, Oxford, p.229 , 2005.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am J of Trop Med and Hyg**, v. 62, p. 460-65, 2000.

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.

MURELL, A.; CAMPBELL, N.J.H.; BARKER, S.C. A total evidence phylogeny of tick provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Mol Phylog and Evol**, v.21, p.244-258, 2001.

NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. D.A . Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali* . **Med and Vet Entomol.** v. 20, n. 4, p. 353–357, 2006.

NOKKALA, S.; GROZEVA, S. Aquiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleoptrata* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). **Caryologia**, v. 53, n. 1, p. 5-8, 2000.

NOKKALA, S. NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis of collochore type in the heteropteran family Miridae. **Hereditas**, v. 105, p. 193-297, 1986a.

NOKKALA, S. NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in *Anthocoris nemorum* (Hemiptera, Anthocoridae). **Hereditas**, v. 105, p. 287-289, 1986b.

NOKKALA, S. NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in the Heteropteran genus *Nabis* (Nabidae, Heteroptera), **Hereditas**, v. 101, p. 31-35, 1984.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; BRESSA, M.J.; GREIZERSTEIN, E.J., LÍA, V.; POGGIO, L. Behavior of ring bivalents in holocentric systems : Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). **Chr Res**, v. 11, p. 725-733, 2003.

- 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.
- REBAGLIATI, P.J.; MOLA, M.L. PAPESCHI, A.G.; GRAZIA, J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review, **J Zoo Syst & Evol Res**, v. 43, n. 3, p. 199-213, 2005.
- RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosoma italicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.
- SACCONI, C. **The evolution of mitochondrial DNA**. *Current Opinion in Genetic and Development*. v. 4, p. 875-881, 1994.
- SCHAEFER, C.W.; PANIZZI, A.R. **Economic Importance of Heteroptera: A General View**. CRC press, Nature, 2000.
- SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **J Morph**, v. 67, p. 123-141, 1940.
- SCHRADER, F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. **Cytologia** (Toldo), v. 6, p. 422-430, 1935.
- SHERBAKOV, D.E.; POPOV, Y.A. **Superorder Cimicidae Laicharting, 1781**. Order Hemiptera Linne, 1758. The Bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. In History of insects A.P. Rasnitsyn, DLJ Quicke eds 143-57, The Nether.: Kluwer Academic. 517p., 2002.
- SCHUH, R.T.; BROWER, A.V.Z., **Biological Systematics principles and applications**. **Cornell University Press**, Ithaca, p.311, 2009.
- SCHUH, R.T.; POLHEMUS, J.T. Revision and analysis of *Pseudosaldula* Cobben (Insecta: Hemiptera:Saldidae): a group with a classic Andean distribution. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 323, p.1-102, 2009.
- SCHUH, T.T.; SLATER, J.A. **True bugs of the world (Hemiptera:Heteroptera) Classification and natural history**. Cornell UNIVERSITY press, Ithaca, New York, xii, 338pp, 1995.
- SCHUH, R.T. The influence of cladistics on heteropteran classification. **Ann. Rev. Entomol.** v.31,p. 67-93, 1986.
- SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Micro Electr y Biol Cel**, v. 11, p. 179-195, 1987.
- SONG, N.; LIANG, A.; CHUAN, M. The complete mitochondrial genome sequence of the planthopper, *Sivaloka damnosus*. **J of Ins Sci**, v.10, 2009.
- SOUZA, H. V.; SOUZA F.B.; MARUYAMA S.R.C.; CASTANHOLE, M.M.U.; ITOYAMA, M. M. Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of



Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. **Gens and Mol Res**, v.8, n.4, p. 1383-1396, 2009.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Pattern of Ag-staining during meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Gen and Mol Res**, v. 7, n. 1, p. 196-206, 2008.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical aspects of testicular cells in economically important species of Coreidae family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007a.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **Eur J of Ent**, v. 104, p. 353-362, 2007b.

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 doi: 10.1007/s004120050410.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trend Ecol Evol**, v. 15, p. 199–203, 2000

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

XIE Q.; TIAN, Y.; ZHENG, L.; BU, W. 18S rDNA hyperlongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). **Mol Phylogenet Evol** , v.47, p.463-471, 2008.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. **Annu. Rev. Entomol.**, v.56, p. 487-510, 2011.

WEIRAUCH. C.; MUNRO, J.B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.53, p.287–99, 2009.

WHEELER, W.C.; SCHUH, R.T.; BANG, R. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. **Entomol Scand** , v.24, p. 121-137, 1993.

WHITING, M.F.; CARPENTER, J.C.; WHEELER, Q.D.; WHEELER, W.C. The Shepsitera problem: Phylogeny of the holometabolus insect orders inferred from 18S ad 28S ribosomal DNA sequence and morphology. **Syst. Biol.** v.46, p 1-68, 1997.

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