



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Cecília Ártico Banho

Caracterização filogenética de percevejos terrestres das famílias Coreidae e
Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) por meio de marcadores
moleculares

São José do Rio Preto
2016

Cecília Ártico Banho

Caracterização filogenética de percevejos terrestres das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) por meio de marcadores moleculares

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto
2016

Banho, Cecília Ártico.

Caracterização filogenética de percevejos terrestres das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) por meio de marcadores moleculares / Cecília Ártico Banho. -- São José do Rio Preto, 2016

73 f. : il., tabs.

Orientador: Mary Massumi Itoyama

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Percevejo (Inseto) – Filogenia. 3. Hemiptera. 4. Genes. 5. Marcadores genéticos. 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 - Câmpus de São José do Rio Preto

Cecília Ártico Banho

Caracterização filogenética de percevejos terrestres das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) por meio de marcadores moleculares

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

Comissão Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Mary Massumi Itoyama
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

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

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
UNESP- Araraquara

São José do Rio Preto
02 de março de 2016

*“Dedico este trabalho aos meus pais,
Rozangela de Fátima Ártico e Claudio Banho e
ao meu irmão Vitor Henrique Ártico Banho,
que sempre foram amorosos e me apoiaram
incondicionalmente. Muito obrigada”.*

Agradecimentos

À Deus, por todo amparo, proteção e força para enfrentar as adversidades do caminho;

Aos meus pais, Rozangela de Fátima Ártico e Claudio Banho, que sempre estiveram presentes, apoiando minhas escolhas, guiando meus passos, com muito incentivo e amor, mas, principalmente, pelos preciosos ensinamentos que serão levados por toda a vida;

Ao meu irmão, Vitor Ártico Banho, pelo companheirismo, confiança e compreensão;

À minha orientadora, Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pela preciosa oportunidade de fazer pesquisa, e por ter nos ensinado a trabalhar com muita dedicação, fazendo o melhor que pudermos, estando presente nos momentos bons e nos mais difíceis, nos dando o alicerce necessário para a formação de pesquisadores, mentes críticas e pessoas de caráter;

Aos meus avós, Izaura Orlando Banho, Natalino Banho, Sebastiana Caetano Ártico e Denilson Ártico, por todo auxílio, pelas palavras de incentivo, de carinho, por serem exemplos de amor, compreensão e trabalho duro.

A todos os queridos amigos que fiz durante os anos de graduação e pós-graduação, que sempre levarei comigo, mas em especial à Ana Letícia Guerra, Marina Carrara Dias, Vanessa Leiko Oikawa Cardoso, Vanessa Ubinatti Teixeira, Keila Cristina Dantas, Wandria Coelho e Isabela Batalhão, por serem minha segunda família, por todos os desabafos, risos, as longas conversas, os momentos maravilhosos e também difíceis, que nos ensinaram a crescer, ser pessoas melhores, e que fortaleceu cada vez mais nossa amizade, que com certeza será levada para toda a vida. Nunca esquecerei vocês;

Aos meus queridos e preciosos amigos e companheiros de trabalho, Tatiani Seni de Souza Firmino, Luis Lenin Vicente Pereira, Fernando Cesar Silva Junior e Emi Rosane

Silistino de Souza, por serem pessoas maravilhosas, companheiras, divertidas, por sermos uma família, por serem pessoas que eu realmente admiro;

Aos queridos amigos que já passaram pelo laboratório, Hederson Vinícius de Souza, Marcia Urbanin Castanhole e Mariana Oliveira Gomes, que são exemplos de pesquisadores, que me auxiliaram muito, sempre muito dedicados, atenciosos e pacientes, para os quais eu desejo toda a sorte e felicidade do mundo;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de São José do Rio Preto, que me acolheu, permitindo a realização deste sonho;

Aos docentes e funcionários da UNESP, por todos os ensinamentos, pela amizade, pelo exemplo de profissionalismo e amor à pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética coordenado pela Profa. Dra. Claudia Márcia Aparecida Carareto

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e preciosa contribuição ao trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Agradeço imensamente a todos que durante esses anos cruzaram meu caminho, e que acrescentaram conhecimentos e experiências que sem dúvida serão sempre levados e seguidos. Agradeço, em especial, a todos aqueles que contribuíram para minha formação intelectual e moral, permitindo que hoje mais uma etapa seja concluída e acima de tudo, que este sonho seja realizado. A todos, Muito Obrigada!

*”Uma mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)*

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
I. INTRODUÇÃO	12
II. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
III. CAPÍTULOS	23
Artigo I. Inferências evolutivas de Pentatomidae e Coreidae (Heteroptera, Pentatomomorpha) por meio dos genes nucleares 18S e 28S	25
Artigo II. Análise filogenética das subfamílias Edessinae, Pentatominae e Discocephalinae (Heteroptera, Pentatomidae) a partir dos genes mitocondriais 16S e ND5 e nucleares 18S e 28S	44
IV. DISCUSSÃO GERAL	62
V. CONCLUSÕES	67
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

Pentatomomorpha é composta por cerca de 14.000 espécies, distribuídas em seis superfamílias, entre as quais estão inclusas Pentatomoidea e Coreoidea. Pentatomoidea possui 7.000 espécies distribuídas em 15 famílias, das quais Pentatomidae é a maior, com 4.500 espécies e 760 gêneros, estando representados no Estado de São Paulo 163 espécies. A superfamília Coreoidea é composta por cinco famílias, contudo apenas Coreidae, Rophalidae e Alydidae estão presentes no Neotrópico. A família Coreidae possui 1.884 espécies, divididas em quatro subfamílias, das quais Coreinae tem oito tribos com representantes no Brasil. Embora as famílias Pentatomidae e Coreidae apresentem um significativo papel como pragas de culturas agrícolas, são escassas análises cladísticas envolvendo esses táxons, o que resulta na ausência de uma única hipótese de classificação, tornando pesquisas com abordagens de sistemática filogenética necessárias para essas famílias. Portanto, o presente estudo buscou caracterizar as relações filogenéticas das famílias Pentatomidae e suas subfamílias por meio dos genes 16S, ND5 (mitocondriais), 18S e 28S (nucleares) e da família Coreidae e sua respectiva subfamília Coreinae por meio dos genes 18S e 28S. Objetivou-se também, confirmar a classificação atual das tribos e subfamílias das espécies de Pentatomidae e Coreidae, que é embasada em caracteres morfológicos, assim como avaliar a variabilidade genética das sequências correspondentes aos genes mitocondriais e nucleares analisados. A partir dos resultados foi observado que os genes nucleares são conservados ao passo que os mitocondriais são altamente variáveis e com tendência as bases AT. Este estudo evidenciou que os genes nucleares 18S e 28S não são ideais para resoluções filogenéticas em nível de famílias, subfamílias e tribos de Coreidae e Pentatomidae, visto que os suportes dos ramos não permitem que haja confiabilidade nas análises. Além disso, alguns grupos que são considerados monofiléticos, com base em caracteres morfológicos, como as subfamílias de Pentatomidae, não tiveram sua monofilia resgatada. Contudo ao considerar as topologias obtidas com os genes nucleares aliados aos mitocondriais, para a família Pentatomidae, obteve-se alto suporte nos ramos, e, portanto, grande confiabilidade nas análises, resgatando a monofilia da maioria das tribos estudadas. Dessa forma, estudos utilizando diferentes marcadores moleculares, em especial, genes mitocondriais, são necessários, pois podem auxiliar no esclarecimento e suporte da classificação atual das relações intrafamiliares de Pentatomidae e Coreidae que permanecem pendentes.

Palavras-chave: Pentatomoidea, Coreoidea, genes mitocondriais, genes nucleares

ABSTRACT

Pentatomomorpha consists about 14.000 species distributed in six superfamilies, to which *Pentatomoidea* and *Coreoidea* are included. *Pentatomidae* has 7000 species in 15 families, of which *Pentatomidae* is the largest, with 4500 species and 760 genera, although in the state of São Paulo only 163 species are present. The *Coreoidea* superfamily consists of five families, however only *Coreidae*, *Rophalidae* and *Alydidae* are present in the Neotropics. The *Coreidae* family has 1884 species, divided into four subfamilies, of which *Coreinae* has eight tribes with representatives in Brazil. Although *Pentatomidae* and *Coreidae* families have a significant role as pests of agricultural crops, the cladistic analysis involving these taxa are scarce, which results in the absence of a single hypothesis classification, making research on phylogenetic systematic approaches necessary for these families. Therefore, this study aimed to characterize the phylogenetic relationships of *Pentatomidae* families and subfamilies through the 16S, ND5, 18S and 28S genes and *Coreidae* family and their respective *Coreinae* subfamily through the 18S and 28S genes. We aimed also to confirm the current classification of tribes and subfamilies of *Pentatomidae* and *Coreidae*, which is grounded on morphological characters, as well as to evaluate the genetic variability of the sequences corresponding to the mitochondrial and nuclear genes analyzed. From the results it was observed that the nuclear genes are conserved while the mitochondrial are highly variable and tend to AT base. Our study showed that nuclear genes 18S and 28S are not ideal for phylogenetic resolution at the level of families, subfamilies and tribes of *Coreidae* and *Pentatomidae*, because the supports of the branches do not allow that there is confiability in the analysis. Furthermore, groups considered monophyletic, based on morphological characteristics, such as *Pentatomidae* subfamilies, have not had their monophyly rescued. But when we consider the topologies obtained with nuclear genes combined with mitochondrial genes for the *Pentatomidae* family, we had high support in the branches, and thus high confiability in the analysis, rescuing the monophyly of most of the studied tribes. Thus, studies using different molecular markers, in particular mitochondrial genes are needed, because they can help in understanding and support of the current classification of intra-family relations *Pentatomidae* and *Coreidae* that remain pending.

Key-words: Pentatomoidea, Coreoidea, mitochondrial genes, nuclear genes

I. INTRODUÇÃO

Hemiptera é o quinto maior grupo de insetos, com aproximadamente 82.000 espécies descritas (CRYAN; URBAN, 2012). É composto por quatro subordens, sendo elas Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha e Heteroptera (FORERO, 2008), constituindo um dos grupos mais numerosos entre os hemimetábolos com sua monofilia sendo reconhecida com base em estruturas bucais específicas da mandíbula e da maxila (FORERO, 2008).

A Subordem Heteroptera, constitui parte da radiação mais bem sucedida de insetos não holometábolos (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). É composta por sete infraordens (Leptopodomorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Pentatomomorpha, Cimicomorpha, Dipsocoromorpha e Enicocephalomorpha) com, aproximadamente, 80 famílias (SCHUH; SLATER, 1995) e mais de 40.000 espécies descritas (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Os representantes de Heteroptera possuem grande diversidade de habitats, podendo ser aquáticos, terrestres e parasitos de pássaros e morcegos, bem como inúmeros hábitos alimentares, como fitófagos, predadores ou hematófagos (vetor da doença de Chagas aos humanos e a raiva aos morcegos) (SCHUH; SLATER, 1995).

Pelo fato da maioria dos Heteroptera serem fitófagos, podem causar grandes danos às produções agrícolas utilizadas para o consumo humano devido ao seu *status* de praga ou por transmitir doenças às plantas (SCHUH; SLATER, 1995). Contudo, sua importância econômica também envolve espécies benéficas ao homem, como membros da subfamília Asopinae que possui hábito alimentar predador, tornando-se importantes agentes no controle biológico (SCHUH; SLATER, 1995).

De acordo com evidências morfológicas e moleculares, muitos autores assumem Heteroptera como um grupo monofilético (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). No entanto, algumas relações permanecem incertas entre determinados táxons. Há, atualmente, três hipóteses de classificação para as infraordens de Heteroptera, que foram propostas por Wheeler et al (1993) (Figura 1a) e Xie et al (2008) (Figura 1c), que mostram que todas as infraordens são monofiléticas, ao passo que a hipótese de Sherbakov e Popov (2002), com base em evidências morfológicas, que foi congruente com a hipótese de Mahner (1993), assume que Nepomorpha é um táxon irmão do restante dos Heteroptera (Figura 1b) (revisão em WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

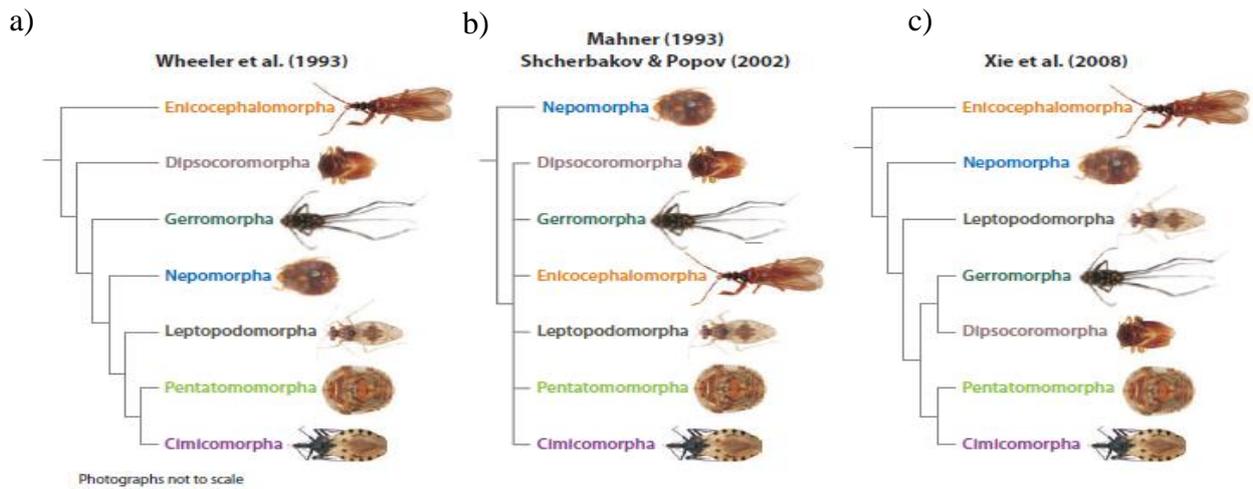


Figura 1. Hipóteses filogenéticas para as infra-ordens de Heteroptera baseadas em a) Wheeler et al (1993); b) Mahner (1993) e Shcherbakov e Popov (2002); c) Xie et al (2008) (revisão em WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

A infraordem Pentatomomorpha é a segunda maior e uma das mais importantes, do ponto de vista econômico, de Heteroptera com aproximadamente 15.000 espécies e 40 famílias em todo o mundo (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Todos os táxons dessa infraordem são terrestres e a maioria se alimenta de plantas, contudo, alguns se alimentam de fungos (representantes de Aradoidea), ou são predadores (representantes de Asopinae, subfamília de Pentatomidae). Devido a grande diversidade e riqueza de espécies as relações filogenéticas entre seus membros ainda não foram totalmente resolvidas (YAO et al, 2012).

Leston et al (1954) classificou Pentatomomorpha baseando-se em estruturas pré-tarsais masculinas, genitália feminina, venação das asas, morfologia dos ovos e nas estruturas das glândulas salivares.

Atualmente, o sistema de classificação de Pentatomomorpha inclui cinco superfamílias (Aradoidea, Pentatomomoidea, Coreioidea, Lygaeoidea e Pyrrhocoroidea). Todos esses táxons, exceto Aradoidea, compõe o grupo Trichophora (HUA et al, 2008).

Na tentativa de auxiliar no esclarecimento da filogenia de Pentatomomorpha, Schaefer (1993), utilizando evidências morfológicas propôs que Aradoidea fosse grupo irmão de Trichophora. Xie et al (2005), tentando solucionar o mesmo problema, por meio de evidências moleculares, a partir do gene ribossomal nuclear 18S (rDNA) para a linhagem Trichophora, propôs o seguinte agrupamento (Pentatomoidea (Pyrrhocoroidea (Coreioidea+Lygaeoidea))). Por outro lado, Li et al (2005) analisaram sequências parciais dos genes 18S e COI (mitocondrial) combinados e isolados para gerar uma filogenia molecular preliminar utilizando 17 famílias de Pentatomomorpha, pertencentes às superfamílias Coreioidea, Lygaeoidea, Pyrrhocoroidea, Pentatomoidea e Aradoidea. Os resultados sugeriram a monofilia de Pentatomomorpha,

colocando Aradoidea como grupo irmão de Trichophora. Trichophora, nesta análise, foi dividido em dois grupos, um composto por Pentatomoidea e outro por Lygaeoidea, Coreoidea e Pyrrhocoroidea. A hipótese mais aceita atualmente, pela maioria dos pesquisadores é Aradoidea como grupo irmão de Pentatomoidea, ambos constituindo um grupo monofilético, e este táxon como grupo irmão de Trichophora (HUA et al, 2008).

Pentatomoidea é o táxon mais diverso em Pentatomomorpha, o qual segundo Henry (1997) foi o primeiro que divergiu no processo evolutivo do grupo. Esta superfamília, na sua maioria, possui hábito alimentar fitófago e compreende cerca de 7.000 espécies distribuídas em 15 famílias (GRAZIA et al, 2008), das quais Acanthosomatidae, Canopidae, Cydnidae, Dinidoridae, Megarididae, Pentatomidae, Phloeidae, Scutelleridae e Tessaratomidae são encontradas na região Neotropical (SCHUH; SLATER, 1995). Das espécies dessa superfamília mais de 600 ocorrem no Brasil, porém, no Estado de São Paulo são registradas 201 espécies, distribuídas em 90 gêneros, nove tribos, oito famílias e cinco subfamílias (GRAZIA et al, 2008). Segundo Grazia et al (2008) algumas sinapomorfias que suportam a monofilia do grupo são, escutelo ultrapassando a metade do comprimento do abdome; tricobótrios abdominais pareados, pelos com a base escura e de fácil reconhecimento com função tátil, ou a de auxiliar no vôo, por meio da detecção de correntes de ar, localizados lateralmente à linha dos espiráculos; abertura da cápsula genital dos machos (= pigóforo) direcionada posteriormente e ovos em forma de barril, ovóides ou esféricos (HENRY, 1997; GRAZIA et al, 2008).

A família Pentatomidae possui, aproximadamente, 4.500 espécies distribuídas em 760 gêneros (GRAZIA et al, 2008), estando representada nas principais regiões faunísticas do globo (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). Esses insetos são conhecidos como Marias-fedidas devido à produção de um odor desagradável emitido pelos ductos das glândulas odoríferas, que se abrem na região das metacoxas nos adultos e no dorso do abdome, nas ninfas. Seus constituintes possuem, geralmente, tamanho médio a grande (5 a 20 mm), e muitas espécies são economicamente importantes, devido ao *status* de pragas agrícolas ou agentes de controle biológico (PANIZZI et al, 2000). Segundo Brown (1997), esses insetos tem um papel importante em florestas Atlânticas, atuando como indicadores ambientais, visto que respondem aumentando ou diminuindo sua diversidade, de acordo com o impacto causado por mudanças ambientais na diversidade taxonômica e química da vegetação.

De acordo com Schuh e Slater (1995) os limites taxonômicos de Pentatomidae eram bastante controversos e pouco definidos. Todavia, esta família foi reconhecida como grupo monofilético por Grazia et al (2008) com base em caracteres morfológicos e moleculares. Neste táxon estão inclusas dez subfamílias (Aphylinae, Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae,

Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae, Serbaninae e Strotarsinae), das quais seis possuem representantes na região Neotropical (SCHUH; SLATER, 1995; GRAZIA et al, 2008; GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). Os fitófagos economicamente mais importantes são espécies pertencentes às subfamílias Edessinae e Pentatominae, englobando a maioria das espécies que afetam plantas cultiváveis. As espécies pertencentes à Asopinae são predadoras, alimentando-se de larvas de corpo mole de outros artrópodes, como lepidópteros e coleópteros (ALDEA, 2013), condição que evoluiu secundariamente (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Dentre as seis subfamílias de Pentatomidae presentes na região neotropical (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae e Strotarsinae), apenas Strotarsinae não está representada no Estado de São Paulo (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011).

Asopinae é subdividida em duas tribos: Asopini e Discocerini. A maioria das espécies da subfamília foi incluída em Asopini, enquanto apenas os gêneros *Discocera* e *Stiretrus* pertencem a Discocerini. Os representantes de Asopinae estão distribuídos em diversas regiões geográficas, como o Velho Mundo onde são encontradas, aproximadamente, 187 espécies e 43 gêneros, ao passo que no Novo Mundo estão representadas 110 espécies em 26 gêneros (GAPON; KONSTANTINOV, 2006).

A subfamília Discocephalinae é dividida em duas tribos, Discocephalini e Ochlerini. A tribo Discocephalini é composta por 47 gêneros e Ochlerini com 28 gêneros (CAMPOS; GRAZIA, 2006). Segundo Rolston (1992), no Estado de São Paulo estão representadas 18 espécies da tribo Discocephalini e sete de Ochlerini.

Pentatominae corresponde à maior subfamília de Pentatomidae com cerca de 620 gêneros e 3.336 espécies. Os membros dessa subfamília possuem variações na forma e coloração, bem como ângulos umerais desenvolvidos e escutelos que não atingem o ápice do abdome (RIDER, 2012). Segundo Rider (2012) essa subfamília possui 42 tribos, entre as quais estão Nezarini com 21 gêneros, Pentatomini com 58 e Carpocorini com 104, sendo assim uma das mais diversas de Pentatomidae. De acordo com Rider (2012), das 42 tribos de Pentatominae, apenas sete estão representadas no Estado de São Paulo, sendo elas, Catacanthini com oito espécies, Carpocorini com 45, Menidini com uma, Nezarini com 12, Pentatomini com 32, Piezodorini com uma e Procliticini também com uma.

A subfamília Edessinae possui, atualmente, 287 espécies distribuídas em seis gêneros, sendo eles *Edessa*, *Brachystethus*, *Peromatus*, *Olbia*, *Pantochlora* e *Doesburgedessa* (SILVA, 2012). Embora esta subfamília tenha um grande número de espécies descritas, possui poucos estudos filogenéticos, apresentando assim problemas taxonômicos e nomenclaturais (SILVA, 2012), tornando os estudos de sistemática filogenética importantes ferramentas para esclarecer

algumas inconsistências que ainda persistem. Dentre os gêneros desse táxon, *Edessa* é o que apresenta os maiores problemas taxonômicos por ser representado por um grande número de espécies muito semelhantes morfológicamente, dificultando a reconstrução de sua história evolutiva (FERNANDES; DOESBURG, 2000).

Embora a família Pentatomidae esteja bem estabelecida como grupo monofilético a classificação de suas subfamílias e tribos ainda é pouco fundamentada em hipóteses filogenéticas (GRAZIA et al, 2008; WEILER, 2011).

Atualmente, estão surgindo novas propostas de classificação para Pentatomidae, sendo umas das principais a utilização de níveis de tribos (CASSIS; GROSS, 2002; RIDER, 2006), o que tem modificado consideravelmente a configuração dos grupos de gêneros, principalmente em Pentatominae (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011).

Segundo Weirauch e Schuh (2011), análises cladísticas e filogenéticas ainda estão em falta para três superfamílias de Pentatomomorpha, sendo elas Aradoidea, Coreoidea e Pyrrhocoroidea. Este fato dificulta a aceitação de uma única classificação, principalmente para Coreoidea, que difere amplamente em número e composição de subfamílias e tribos de acordo com diferentes autores (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Todavia, estudos cladísticos que abrangem níveis sistemáticos inferiores, como tribos e gêneros vem sendo realizados para essas superfamílias, contudo, a maioria deles abrange a descrição ou revisão de gêneros, não incluindo hipóteses filogenéticas, dificultando assim a melhor compreensão desse grupo (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

A superfamília Coreoidea, é composta por cinco famílias (Stenocephalidae, Hyocephalidae, Coreidae, Rhopalidae e Alydidae) sendo que as três últimas são encontradas na região Neotropical. Coreoidea são essencialmente fitófagos, embora haja relatos de coprofagia em espécies de Coreidae (MITCHELL, 2000) e Alydidae (PANIZZI et al 2000). Algumas espécies tem sido consideradas pragas potencialmente importantes no Brasil, como *Anasa sp.* (Coreidae), em cucurbitáceas (MITCHELL, 2000), *Phthia picta* (Drury) (Coreidae), em Solanaceae (MITCHELL, 2000), e *Neomegalotomus parvus* (Westwood) (Alydidae), em soja e outras leguminosas.

Os Coreidae, conhecidos como insetos de folhas nos pés, constituem a família de maior número de espécies dentro de Coreoidea, com 1.884 espécies descritas distribuídas em 257 gêneros (HENRY, 2009). São cosmopolitas, contudo mais concentradas em regiões tropicais. Aproximadamente, 82 espécies têm sido mencionadas, na literatura, como potencialmente prejudiciais às plantações, possuindo assim, grande importância econômica. Dentre as culturas que podem atacar estão as de arroz, tomate, leguminosas, mandioca, abóbora, castanheiras e

muitas frutas, como maracujá, acerola e goiaba (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Segundo Mitchell (2000), a tribo Acanthocerini, inclui espécies como *Athaumatus haematicus* que ataca culturas de batata, algodão, girassol, laranja e berinjela, *Dersagrena flaviventris* que ataca algodão e *Acanthocerus clavipes* que ataca berinjelas. Algumas espécies desta família têm sido descritas como vetores de doenças a algumas plantas, podendo transmitir, por meio da penetração dos estiletes, alguns microorganismos, como fungos e bactérias e também alguns vírus (BOHER et al, 1983).

O conhecimento da fauna de coreídeos na América do Sul é pobre, principalmente quando se considera táxons importantes economicamente (PALL; COSCARÓN, 2013). Essa família foi dividida em três subfamílias por Henry (2009), sendo elas Meropachydinae, Coreinae e Pseudophloeina. Coreinae possui oito tribos representadas no Brasil (Acanthocephalini, Acanthocerini, Anisoscelini, Leptoscelini, Menenotini, Chariesterini, Coreini e Discogastrini). As tribos Acanthocephalini e Anisoscelidini têm como representantes as espécies *Acanthocephala latipes* e *Holymentia histrio*, respectivamente, que vivem em espécies de *Passiflora*, observadas frequentemente no Brasil. A tribo Coreini, é constituída por um grande número de espécies, mas não são consideradas muito importantes do ponto de vista econômico, pois poucas são prejudiciais às plantas cultivadas (COSTA LIMA, 1940).

Os representantes das famílias Pentatomidae e Coreidae, além da grande diversidade e riqueza de espécies apresentam também diversas características divergentes, como o hábito alimentar, o habitat, caracteres citogenéticos e morfológicos, tornando a análise molecular muito importante, visto que, aliado a outros caracteres, pode auxiliar no estudo das suas relações evolutivas, do seu padrão de distribuição e, conseqüentemente, na inferência de possíveis relações de parentesco entre os constituintes de cada uma das famílias, bem como dessas espécies com as demais famílias de Heteroptera. Para tanto, análises moleculares comparativas de sequências de nucleotídeos estão se mostrando cada vez mais necessárias como uma ferramenta para identificar regiões reguladoras no DNA, compreender a história da evolução molecular e deduzir as similaridades e diferenças na organização gênica entre espécies de interesse (SCHWARTZ et al, 2000).

Desde o final da década de 90, sequências de DNA vêm sendo utilizadas como marcadores para inferir as relações evolutivas entre as diversas espécies biológicas (WOESES; FOX, 1977), em abordagens taxonômicas e estudos de biodiversidade (TAUTZ et al, 2002). A utilização dessa ferramenta gerou mudanças fundamentais na sistemática durante os últimos 25 anos (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Em Heteroptera os primeiros estudos moleculares foram realizados por Wheeler et al (1993), utilizando caracteres morfológicos combinados com dados moleculares do gene ribossomal 18S, propondo uma filogenia que mostrava as relações entre suas infraordens. Posteriormente Muraji e Tachikawa (2000) analisaram a infraordem Gerromorpha a partir de sequências dos genes 16S (DNAMt) e 28S (gene nuclear ribossomal). Hebsgaard et al (2004) estudaram as relações filogenéticas em Nepomorpha combinando dados moleculares dos genes 16S, 28S e 18S com 65 caracteres morfológicos. Outra infraordem muito estudada, e que já tem suas relações estabelecidas é a Pentatomomorpha, que foi analisada também por caracteres morfológicos aliados a dados moleculares (gene 18S e Citocromo oxidase I), confirmando seu *status* monofilético (Li et al, 2005). Grazia et al (2008) ao analisar Pentatomoidea a partir de dados moleculares, utilizando os genes 18S, 16S, 28S e COI, juntamente com caracteres morfológicos, reconheceram a monofilia desta superfamília. Neste mesmo estudo ao analisar algumas famílias de Pentatomoidea, foi verificado que Acanthosomatidae e Pentatomidae também são grupos monofiléticos, ao passo que a família Cydnidae se mostrou polifilética. Outro exemplo foi o estudo realizado por Weirauch e Munro (2009), que verificaram táxons da família Reduviidae, como a subfamília Triatominae e as tribos Triatomini e Rhodniini. Embora já tenham sido realizados um grande número de trabalhos que abrangem os mais diversos níveis taxonômicos de Heteroptera, até o momento não foram realizados estudos moleculares para apoiar ou confirmar a história evolutiva das subfamílias de Pentatomidae, pertencente à Pentatomomoidea e Coreidae, pertencente à Coreoidea.

Para a realização destes estudos, o genoma mitocondrial é muito útil, visto que é um dos maiores conjuntos gênicos que podem ser comparados entre diversos táxons animais, sendo uma fonte eficaz para resolver filogenias de níveis taxonômicos menores que famílias (HUA et al, 2009). Na classe Insecta muitos genomas mitocondriais completos já estão disponíveis em bancos de dados, possibilitando a utilização de diversas sequências nucleotídicas ou de aminoácidos para a resolução de problemas filogenéticos (HUA et al, 2009).

A molécula de DNA mitocondrial é considerada um bom marcador para revelar relações filogenéticas entre os diversos grupos de insetos, pois apresenta alta taxa de evolução (YAGI et al, 1999), não possui *íntrons*, sua herança é haplóide e possui, basicamente, genes associados às suas funções (RIVERA et al, 2012).

Em geral, o genoma mitocondrial pode apresentar uma taxa de evolução até dez vezes superior à taxa de evolução de um gene de cópia única nuclear (CORNELI; WARD, 2000; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Isso ocorre porque a molécula não possui mecanismos eficientes de reparo, acumulando mais mutações em comparação ao DNA nuclear e,

além disso, são encontradas em grande número de cópias por célula (GOVEIA, 2010). A maioria das alterações que ocorre em suas sequências são substituições de nucleotídeos simples ou, mais raramente inserções e deleções de um ou alguns nucleotídeos. Considerando esse fato, muitos marcadores mitocondriais, principalmente genes codificantes de proteínas como COI, *Cyt b* e a família NADH, têm sido utilizados para analisar relações filogenéticas em nível de gêneros, espécies ou populações, devido à elevada taxa de substituição na terceira base do códon (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Os genes ribossomais 12S (790-950 pares de base (pb)) e 16S (cerca de 1500 pb) são as sequências mais conservadas do DNAm. Ambos compreendem regiões conservadas intercaladas com regiões variáveis e suas funções são codificar parte do RNA ribossômico (RNAr) que compõe as subunidades maior (16S) e menor (12S) dos ribossomos mitocondriais (GOVEIA, 2010). O gene 16S é mais variável e mais frequentemente utilizado para estudos filogenéticos em nível de famílias e gêneros. Esse gene evidencia diferenças entre espécies pertencentes a tribos e gêneros diversos, todavia deve ser utilizado com cautela para inferências filogenéticas de níveis taxonômicos superiores, como ordens, infraordens e superfamílias (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Os genes mitocondriais codificantes de proteínas, como COI, *Cyt b* e ND1, também tem sido amplamente utilizados em reconstruções filogenéticas. Devido ao fato dessas sequências apresentarem alta variabilidade, geralmente se encaixam bem para estudos de espécies proximamente relacionadas (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Dentre os componentes da família NADH desidrogenase (genes que codificam proteínas que participam do sistema de fosforilação oxidativa) encontra-se o gene ND5, considerado o mais variável dentre a família NADH (SOUZA, 2013), sendo, portanto, um bom marcador para análises estatísticas e de filogenia molecular (YAGI et al, 1999; QUINTERO; NAVARRO, 2012) em nível de grupos taxonômicos como famílias, pois de acordo com Souza (2013) este marcador se mostrou representativo para a realização de inferências evolutivas em agrupamentos abaixo do nível de família.

Genes nucleares em estudos sistemáticos filogenéticos, também são importantes, devido ao seu conteúdo conservado. Dentre esses genes se destacam os marcadores ribossomais 28S e 18S, que codificam RNAr que constituem as subunidades maiores e menores dos ribossomos presentes no citoplasma, aderidos no retículo endoplasmático rugoso, bem como na membrana nuclear, e que realizam toda a síntese proteica da célula.

Os genes ribossomais nucleares de artrópodes são dispostos em matrizes utilizadas em *tanden* com cada unidade contendo genes que codificam a subunidade pequena (18S),

subunidade maior (28S e 5,8S). A molécula de RNAr consiste em segmentos em rápida evolução intercalados entre segmentos conservados. Cada gene do RNAr tem uma taxa diferente de substituição nucleotídica, bem como suas regiões conservadas e variáveis incluídas em cada sequência dos genes 18S e 28S (JORGENSEN; CLUSTER, 1988).

O gene nuclear 18S, possui, cerca de 1.800 a 2.000 pb, apresentando-se muito conservado e, portanto, mais apropriado para resoluções de filogenias de níveis taxonômicos superiores. Esse gene possui informações que permitem avaliar relações entre organismos com tempos de divergência maiores que 100 milhões de anos. Sendo assim, rápidas radiações adaptativas, que ocorreram a um tempo inferior a 40 milhões de anos, geralmente, estão fora de seus limites de resolução (PHILIPPE et al, 1994). Entretanto, de acordo com Mas-Coma e BARGUES (2009) esse marcador molecular pode ser utilizado em análises de espécies distantes no interior do mesmo gênero, pois se mostrou adequado para inferir relações filogenéticas entre gêneros e tribos de triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae).

O gene nuclear ribossomal 28S, possui uma sequência de até 4.000 pb e evolui mais rápido do que o gene 18S, principalmente, por possuir diferentes segmentos de expansão, como as regiões D1, D2 e D3. Estudos utilizando esses genes tem se concentrado em sequências parciais que compreendem um ou mais domínios próximos. A utilidade desses domínios em análises evolutivas pode variar dependendo dos organismos analisados, visto que pode distinguir táxons em diferentes níveis, como subfamílias, famílias, ordens ou classes (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Em análises de filogenia molecular envolvendo níveis de espécies dentro de um mesmo gênero, espécies de gêneros diferentes, e espécies de diferentes tribos da subfamília Triatominae, os marcadores de DNA nuclear 18S e ITS-2 são os mais apropriados, contudo podem ser complementados por dados de 28S e ITS-1. Marcadores mitocondriais, como o 16S também podem ser capazes de fornecer dados complementares importantes para o nível de espécies distantes do mesmo gênero (MAS-COMA; BARGUES, 2009), como se objetivou analisar neste trabalho.

Diante do exposto, foi proposto no presente trabalho a possível inferência das relações filogenéticas evolutivo para espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae. Buscou-se, também, estudar as particularidades dos genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e ND5 individuais e concatenados.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Inferir relações filogenéticas para as espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, por meio de marcadores nucleares e mitocondriais.

Objetivos Específicos

- a) Analisar as relações evolutivas entre táxons das subfamílias de Pentatomidae e das tribos de Coreinae (Coreidae);
- b) Analisar as características das sequências de genes nucleares e mitocondriais, como conteúdo AT/CG e sítios polimórficos para as espécies em estudo;
- c) Fornecer maiores subsídios para as interpretações filogenéticas do grupo.

ARTIGO I

Inferências evolutivas de Pentatomidae e Coreidae (Heteroptera, Pentatomomorpha) por meio dos genes nucleares 18S e 28S

Banho, C. A.; Gomes, M. O.; Almeida, C. E.; Itoyama, M. M.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos.

Rua Cristóvão Colombo, 2265

Jardim Nazareth

CEP: 15054-000

São José do Rio Preto, SP

ce_artico@hotmail.com

Resumo

As famílias Pentatomidae e Coreidae, pertencentes às superfamílias Pentatomoidea e Coreoidea, respectivamente, e a Infraordem Pentatomomorpha, são compostas por espécies consideradas importantes economicamente. Embora apresentem um significativo papel como pragas ou agentes de controle biológico, existem poucos estudos que evidenciam suas relações de parentesco, tornando as pesquisas com abordagens sistemáticas filogenéticas importantes para o melhor conhecimento de suas histórias evolutivas e classificação taxonômica. Dessa forma, estudos utilizando ferramentas moleculares, como genes, podem ser realizados para inferir cenários evolutivos e ajudar a esclarecer inconsistências em relação às posições filogenéticas de suas subfamílias e tribos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo reportar, pela primeira vez na literatura, a reconstrução filogenética utilizando genes nucleares, a partir do método de Inferência Bayesiana, a fim de inferir as possíveis relações entre cinco subfamílias de Pentatomidae e suas tribos, e para as tribos da subfamília Coreinae, pertencente à Coreidae. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar com base nos fragmentos dos genes 18S e 28S, não se pode considerar a família Coreidae como um grupo monofilético e que as relações entre as tribos de Coreinae permaneceram incertas. As inconsistências ainda remanescentes indicam

que a classificação de suas tribos precisa ser revista e melhor analisada taxonomicamente a fim de realizar novas proposições de classificação ou confirmar as já existentes. Em relação às subfamílias de Pentatomidae pode-se observar que Edessinae, Asopinae e Discocephalinae não constituíram grupos monofiléticos, diferentemente do que foi descrito na literatura por alguns autores. A subfamília Pentatominae, por sua vez, apresentou-se polifilética, corroborando dados da literatura que mostram que esse grupo não possui um consenso em relação a sua classificação taxonômica. Os dados obtidos mostram que as análises realizadas são importantes para testar a classificação atual dessas famílias e suas respectivas subfamílias e tribos. No entanto, os resultados também sugerem a importância de realizar análises com outros marcadores moleculares, principalmente genes mitocondriais, a fim de tentar esclarecer as inconsistências ainda presentes e propor novas classificações, se necessário, para esses táxons com grande impacto econômico.

Palavras-chave: Hemiptera, filogenia, Pentatomoidea, Coreoidea

Introdução

A Infraordem Pentatomomorpha é composta por mais de 14.000 espécies, divididas em cinco superfamílias, Aradoidea, Coreoidea, Lygaeoidea, Pentatomoidea e Pyrrhocoroidea (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Esse táxon inclui a maioria das espécies fitófagas, que se alimentam da seiva presente no sistema vascular de frutos e sementes de diversas plantas, podendo prejudicar vegetações cultivadas, como soja, arroz, feijão, milho, maracujá, assim como plantas nativas (ALDEA, 2013). Entretanto, também existem espécies consideradas benéficas, do ponto de vista humano, visto que podem atuar como agentes do controle biológico ao se alimentarem de larvas de corpo mole de Leptodoptera, Diptera e Hymenoptera (GRAZIA; SCHWERTNER, 2008). Esses insetos têm, portanto, hábito predador e são representados, principalmente, por membros da subfamília Asopinae de Pentatomidae (ALDEA, 2013).

Esta infraordem foi, de acordo com Li et al (2005) considerada um grupo monofilético, suportado por análises que levaram em consideração caracteres morfológicos e moleculares, por meio da utilização de fragmentos dos gene nuclear 18S e mitocondrial COI.

Dentre as superfamílias de Pentatomomorpha, Pentatomoidea e Coreoidea apresentam as espécies que mais atacam plantações. Pentatomoidea é o táxon mais diverso de Pentatomomorpha, possuindo 7.000 espécies incluídas em 15 famílias, das quais, Acanthosomatidae, Canopidae, Cydnidae, Dinidoridae, Megarididae, Pentatomidae, Phloeidae,

Scutelleridae, Tessaratomidae e Thyreocoridae são encontradas na região Neotropical (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011).

Pentatomidae, pertencente à Pentatomoidea, é quarta maior família de Heteroptera com, aproximadamente, 4.500 espécies e 760 gêneros descritos mundialmente. É subdivida em dez subfamílias (GRAZIA et al, 2008), contudo, apenas Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae e Strotarsinae estão presentes na região Neotropical (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). No Estado de São Paulo a diversidade de pentatomídeos é grande, compreendendo 71 gêneros e 163 espécies, aproximadamente. Dentre as subfamílias apresentadas, nessa região apenas Strotarsinae não possui representantes descritos (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011).

Taxonomicamente, algumas subfamílias ainda podem ser divididas em tribos, como ocorre com Discocephalinae, que de acordo com Rolston (1992) possui duas tribos, Discocephalini com 18 espécies e Ochlerini com sete espécies, ambas registradas no Estado de São Paulo. A subfamília Pentatominae, segundo a proposta de Rider (2012), possui 42 tribos, no entanto sete são representadas no Estado de São Paulo, sendo elas Catacanthini, com oito espécies, Carpocorini com 45 espécies, Menidini com uma espécie, Nezarini com 12 espécies, Pentatomini com 32 espécies, Piezodorini com uma espécie e Procliticini com uma espécie. Nesse Estado, de acordo com Grazia e Schwertner (2011) Pentatomidae é a família mais numerosa de Pentatomoidea, correspondendo a 80% das espécies registradas, e mundialmente, engloba 65% das espécies desta superfamília.

A superfamília Coreoidea, é constituída por cinco famílias Stenocephalidae, Hyocephalidae, Coreidae, Rhopalidae e Alydidae, sendo que apenas as três últimas são encontradas na região Neotropical. Embora seja de grande importância, análises cladísticas estão em falta para essa superfamília, bem como para os demais táxons que as compõe, o que resulta na ausência de uma única hipótese de classificação, levando a diferentes números e composições de subfamílias e tribos (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Segundo Henry (2009) a família Coreidae, apresenta 1.884 espécies e 267 gêneros descritos, sendo dividida em três subfamílias, Pseudophloeinae, Meropachydinae e Coreinae. De acordo com Packauskas (2010), provavelmente, o grupo mais derivado seja Pseudophloeinae, que está presente em todo o mundo. A segunda subfamília mais derivada seria Meropachyinae, com ocorrência apenas no Novo Mundo, ao passo que Coreinae, seria a subfamília mais recente. Essa subfamília é classificada, atualmente, com 12 tribos, das quais 10 ocorrem exclusivamente no Novo Mundo, assim como na maior parte dos trópicos. As duas tribos restantes ocorrem no Velho e no Novo Mundo, no entanto, os gêneros presentes em cada local são diferentes

(PACKAUSKAS, 2010). Dentre as tribos de Coreinae encontradas no Brasil, podemos destacar Acanthocephalini, Mictini, Anisoscelidini, Leptoscelini, Chariesterini, Coreini, Discogasterini e Acanthocerini (COSTA LIMA, 1940).

O conhecimento da fauna de Coreidae da América do Sul é pequeno, principalmente, quando se considera táxons que causam prejuízos as culturas agrícolas. Isto ocorre porque chaves abrangentes para identificação das espécies nesta região são escassas, assim como estudos cladísticos e de filogenia molecular (PALL; COSCARÓN, 2013).

Genes nucleares em estudos sistemáticos filogenéticos são importantes marcadores devido ao seu conteúdo conservado, como os genes 28S e 18S, os quais codificam o RNAr que constituem as subunidades maiores e menores dos ribossomos presentes no citoplasma celular.

Esses marcadores foram amplamente utilizados em estudos com diversos grupos de Heteroptera. Como exemplos temos os trabalhos de Hua et al (2008) que recuperou a monofilia de Pentatomoidea, utilizando o marcador 28S em conjunto com outros genes mitocondriais e de Li et al (2005), que propôs a monofilia de Pentatomomorpha ao analisar esse táxon com base no marcador 18S juntamente com o gene COI (mitocondrial) e dados morfológicos. Portanto o presente estudo buscou construir um cenário evolutivo para espécies das famílias Pentatomidae e Coreidae do Noroeste do Estado de São Paulo a partir dos genes nucleares 18 e 28S, assim como testar a classificação atual de suas subfamílias e tribos, fornecendo subsídios para as interpretações taxonômicas e filogenéticas de Coreidae e Pentatomidae.

Material e métodos

Foram analisadas 50 espécies, das quais 18 pertencem à família Coreidae, 31 pertencentes à Pentatomidae e uma espécie da família Aphididae (*Aphis gossypii*) utilizada como grupo externo. No presente trabalho, para algumas espécies, foram utilizadas as sequências dos genes 18S e 28S que estavam disponíveis no Banco de dados do NCBI, ao passo que para as outras foram realizadas amplificações dos genes nucleares, como listadas na Tabela 1. As espécies foram coletadas na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W), fixadas em etanol absoluto e identificadas.

A extração de DNA foi realizada a partir de fragmentos da musculatura torácica utilizando *Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit* (GE healthcare). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações em cadeia da polimerase foram *forward* 5'- CCCGTCTTGAAACACGGACCAA -3 e *reverse* 5'-CCACAGCGCCAGTTCTGCTTAC -3, para o gene 28S (MURAJI; TACHIKAWA, 2000) e *forward* 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCA-

3' e reverse 5-CTGAGATCCAACTACGA GCTT -3' para o gene 18S (BARGUES; MASCOMA, 1997).

As ampliações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler em um volume total de reação de 15 µL, utilizando 100 ng de DNA; 0,3 µL a 10 mM de cada par de oligonucleotídeo; 0,3 µL a 100 mM de dNTP; 1,5 µL de buffer, 0,44 µL a 50 mM de MgCl₂ e 0,06 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Os ciclos para amplificação utilizados seguiram as indicações do fabricante (*Platinum Taq DNA Polymerase*), com as temperaturas de anelamento adequadas para cada par de oligonucleotídeo iniciador, sendo 50 para o gene 28S e 52°C para o 18S.

Os produtos de PCR foram purificados, utilizando kit “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”, seguindo o protocolo que o acompanha, sem modificações. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, de acordo com o protocolo para Mega BACE 1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*). As sequências obtidas para os genes 18S e 28S serão, posteriormente, depositadas no banco de dados do NCBI.

As sequências obtidas foram validadas por meio da sua submissão a ferramenta *Nucleotide-Blast* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A partir das sequências *forward* e *reverse* construíram-se sequências consenso, as quais foram utilizadas nas análises filogenéticas. As regiões gênicas amplificadas foram alinhadas utilizando o software “*ClustalW Multiple Alignment*” do “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.9.0*” (HALL, 1999). Para a escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica foi utilizado o programa JModelTest (POSADA, 2008), seguindo o critério AIC (*Akaike information criterion*), que resultou no modelo GTR+I+G para as sequências dos genes 18S e 28S concatenados, que foram utilizados para as reconstruções filogenéticas por Inferência Bayesiana. No Programa MEGA 6.0 (TAMURA et al, 2013) foram realizadas análises estatísticas de composição de bases e presença de polimorfismos para cada conjunto de dados, isto é, para cada gene separado, bem como para as sequências concatenadas. Neste programa também foi construída uma matriz de distância genética para as espécies, utilizando o critério “*p-distance*”.

A análise de Inferência Bayesiana foi realizada no programa MrBayes 3.1 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) utilizando os genes nucleares 18S e 28S em conjunto, e seu respectivo modelo de substituição nucleotídica. Foram realizadas duas corridas independentes, com quatro cadeias de MMCC e dois milhões de gerações corridas. O burn-in obtido foi de 25%. O suporte nos ramos corresponde a *bootstrap* de 100%, sendo mostrados apenas os que obtiveram valores acima de 50%.

Tabela 1. Classificação taxonômica das espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae utilizadas no presente estudo

Família	Subfamília	Tribos	Espécies	Sequências	
				18S	28S
Aphididae			<i>Aphis gossypii</i> (Glover, 1877)	Presente trabalho	Presente trabalho
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	<i>Anisoscelis foliacea</i> (Dallas, 1852)	KC537009	KC796318
			<i>Holhymenia histrio</i> (Fabricius, 1803)	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Leptoglossus gonagra</i> (Fabricius, 1775)	KC537016	KC796320
			<i>Leptoglossus zonatus</i> (Dallas, 1852)	KC537017	KC796321
		Acantocephalini	<i>Acanthocephala parensis</i> (Dallas, 1852)	Presente trabalho	Presente trabalho
		Acanthocerini	<i>Athaumastus haematicus</i> (Stål, 1860)	KC537010	KC796322
		Chariesterini	<i>Chariesterus armatus</i> (Thunberg, 1825)	KC537012	KC796324
		Coreini	<i>Anasa bellator</i> (Fabricius, 1787)	KC537008	KC796325
	<i>Catorhintha guttula</i> (Fabricius, 1794)		KC537011	KC796326	
	<i>Hypselonotus fulvus</i> (De Geer, 1775)		KC537015	KC796328	
	<i>Sphictyrtus fasciatus</i> (Bergroth, 1913)		KC537018	KC796329	
	<i>Zicca annulata</i> (Burmeister, 1835)		KC537019	KC796331	
		Leptoscelini	<i>Dallacoris obscura</i> (Stål, 1867)	KC537013	KC796332
	<i>Dallacoris pictus</i> (Drury 1770)		KC537014	KC796333	
		Menenotini	<i>Corecoris fuscus</i> (Thunberg, 1783)	Presente trabalho	Presente trabalho
	Mictini	<i>Crinocerus sanctus</i> (Fabricius, 1775)	Presente trabalho	Presente trabalho	
<i>Pachylis laticornis</i> (Fabricius, 1798)		Presente trabalho	Presente trabalho		
Pentatomidae	Asopinae		<i>Alcaeorrhynchus grandis</i> (Dallas, 1852)	Presente trabalho	Presente trabalho
		<i>Oplomus salamandra</i> (Burmeister, 1835)	Presente trabalho	Presente trabalho	
		<i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho	
		<i>Tynacantha marginata</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho	
	Discocephalinae	Discocephalini	<i>Antiteuchus tripterus</i> (Fabricius, 1787)	KC537045	KC796334
			<i>Dinocoris corrosus</i> (Herrich-Schäffer, 1844)	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Platycarenum umbractulatus</i> (Fabricius, 1803)	KC537055	KC796336
	Edesinae	Edessini	<i>Edessa collaris</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Edessa meditabunda</i> (Fabricius, 1794)	KC537048	KC796337
			<i>Edessa leucogramma</i> (Perty, 1833)	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Edessa polyta</i> (Lepeletier & Serville, 1825)	Presente trabalho	Presente trabalho
	Pentatominae	Carpocorini	<i>Agroecus griseus</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Dichelops melacanthus</i> (Dallas, 1851)	KC537047	KC796339
			<i>Euschistus heros</i> (Fabricius, 1794)	KC537049	KC796340
			<i>Ladeachistus</i> sp.	Presente trabalho	Presente trabalho
			<i>Mormidea v-luteum</i> (Lichtenstein, 1796)	KC537051	KC796342
			<i>Oebalus ypsilon</i> (De Geer 1773)	KC537053	KC796345
			<i>Oebalus poecilus</i> (Dallas, 1851)	KC537052	KC796344
<i>Proxys albopunctulatus</i> (Palisot de Beauvois, 1805)			KC537056	KC796349	
Nezarini		<i>Chinavia impicticornis</i> (Stål, 1872)	Presente trabalho	Presente trabalho	
		<i>Nezara viridula</i> (Linnaeus, 1758)	Presente trabalho	Presente trabalho	
Pentatomini		<i>Arvelius albopunctatus</i> (De Geer, 1773)	Presente trabalho	Presente trabalho	
		<i>Chlorocoris complanatus</i> (Guerin-Meneville, 1831)	KC537046	KC796347	
		<i>Loxa deducta</i> (Walker, 1867)	KC537050	KC796348	
		<i>Loxa virescens</i> (Amyot & Serville, 1843)	Presente trabalho	Presente trabalho	

	<i>Mayrinia curvidens</i> (Mayr, 1864)	Presente trabalho	Presente trabalho
	<i>Pellaea stictica</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho
	<i>Stictochilus tripunctatus</i> Bergroth, 1918	Presente trabalho	Presente trabalho
Piezodorini	<i>Piezodorus guildinii</i> (Westwood, 1837)	KC537054	KC796353
<i>Incertae sedis</i>	<i>Thyanta perditor</i> (Fabricius, 1794)	KC537057	KC796351
	<i>Thyanta humilis</i> (Bergroth, 1891)	Presente trabalho	Presente trabalho

Resultados

Variabilidade das sequências gênicas

Ao analisar os dados obtidos a partir das sequências dos genes 18S e 28S para as espécies em questão, foi evidenciado alto grau de conservação em ambos os genes. Esse resultado pode ser verificado com base na Tabela 2. O fragmento gênico 18S apresentou 18,5% de sítios variáveis e 5,2% de parcimoniosos (informativos para a reconstrução de filogramas) em uma sequência de 589 pares de base. Por outro lado, o fragmento gênico 28S obteve 19,6% sítios variáveis e apenas 3,9% sítios parcimoniosos (Tabela 2), evidenciando que embora seja mais variado que o gene 18S, possui menos sítios informativos, importantes em reconstruções filogenéticas.

Por meio da análise dos marcadores nucleares pode-se verificar, também, maior porcentagem de bases CG, correspondendo a 51,6 e 54,8% para os genes 18S e 28S, respectivamente. Outro dado importante está relacionado à proporção de mutações pontuais nas sequências, visto que para o marcador 18S foi observado um total de 525 transições e sete transversões. Dados semelhantes foram obtidos para o marcador molecular 28S, uma vez que a quantidade de transições visualizadas foi de 352 e apenas quatro mutações do tipo transversão.

Ao analisar os fragmentos gênicos concatenados, o resultado foi semelhante ao obtido para os marcadores separados, visto que apresentou baixas taxas de sítios variáveis e parcimoniosos, assim como maior composição nucleotídica de base CG. Em relação à taxa de mutações observadas, os genes concatenados apresentaram 876 transições e 11 transversões.

Ao verificar a matriz de distância obtida para os marcadores moleculares nucleares em conjunto, observou-se uma distância genética média muito baixa para espécies de superfamílias, famílias, subfamílias e tribos distintas, sendo ela de 1,9%. A maior distância obtida entre as espécies de Pentatomidae e Coreidae foi de 3,8% (entre *Corecoris fuscus* e *Piezodorus guildinii*) ao passo que a menor distância foi de 1,6% (entre *Anisoscelis foliacea* e *Chlorocoris complanatus*).

Tabela 2. Estatística descritiva das sequências dos genes nucleares 18S e 28S para as espécies analisadas no presente estudo.

Composição Nucleotídica	Fragmento gênico 18S	Fragmento gênico 28S	Fragmentos gênicos 18S e 28S concatenados
Comprimento (pb)	589	378	966
N. sítios Conservados	433 (73,5%)	290 (76,7%)	722 (74,6%)
N. sítios Variáveis	109 (18,5%)	74 (19,6%)	183 (18,9%)
N sítios Parcimoniosos	31 (5,2%)	15 (3,9%)	46 (4,76%)
N. sítios Únicos	74 (12,5%)	57 (15,0%)	131 (13,56%)
%AT	48,3%	45,2%	47,1%
%CG	51,7%	54,8%	52,9%
Si/Sv	4,00	2,00	6,00

Reconstrução filogenética

A partir da análise com os genes nucleares concatenados pode-se verificar que a família Pentatomidae constituiu um grupo monofilético com alto suporte nos ramos (Figura 1), ao passo que Coreidae não apresentou essa conformação.

Ao se observar a topologia obtida pode-se constatar que os marcadores em questão não foram capazes de resolver as relações intrafamiliares analisadas, visto que as subfamílias e tribos de Pentatomidae e as tribos de Coreinae não constituíram grupos monofiléticos e apresentaram baixos valores de *bootstrap*, indicando baixa confiabilidade nos ramos.

Em relação as subfamília de Pentatomidae, Asopinae mostrou-se parafilética, ao passo que Discocephalinae se comportou como polifética, assim como a subfamília Pentatominae e as espécies da subfamília Edessinae não se agruparam (Figura 1).

A subfamília Pentatominae, que neste estudo, é mais numerosa, não obteve nenhum padrão de agrupamento para suas tribos, de modo que todas (Nezarini, Carpocorini, Piezodorini, *Incertae sedis* e Pentatomini) não constituíram grupos monofiléticos. Um dado importante observado foi que a espécie *Chlorocoris complanatus*, pertencente à subfamília Pentatominae, tribo Pentatomini, apresentou-se externa às demais subfamílias (Figura 1).

Em relação à família Coreidae, nenhum padrão de agrupamento para suas tribos foi observado, de modo que Anisoscelidini e Coreini formaram grupos polifiléticos, ao passo que Mictini foi parafilética (Figura 1). As espécies da tribo Leptoscelini, *Dallacoris pictus* e *D. obscura*, agruparam-se com alto suporte com *Leptoglossus gonagra* e *L. zonatus*, indicando que essas espécies podem ser proximamente relacionadas, embora pertençam a tribos distintas.

Discussão

Variabilidade das sequências gênicas

Com base nos resultados obtidos para as sequências individuais e concatenadas dos marcadores nucleares ribossomais 18S e 28S foi observado que os genes são altamente conservados, para as espécies das famílias Pentatomidae e Coreidae. De acordo com Philippe et al (1994) o gene 18S possui alto grau de conservação, sendo apropriado para a resolução de filogenias de níveis taxonômicos superiores, como ordens, infraordens e superfamílias. Ao analisar esse marcador para espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, Souza (2013) encontrou resultados semelhantes, visto que verificou 97,22% e 97,10% de sítios conservados para Coreidae e Pentatomidae, respectivamente. Segundo Escalante e Ayala (1995), o gene 18S apresenta taxa de 0,8% de substituições por sítio por 100 m.a. Essa taxa de evolução, segundo BARGUES et al (2000), pode refletir a taxa de substituição do gene todo, contudo, taxas de evolução de 2% de substituições por sítio por 100 m.a. podem ocorrer em porções do gene 18S que possuem evolução mais rápida.

O gene nuclear ribossomal 28S, embora seja altamente conservado, pode evoluir mais rápido que o 18S, principalmente, por possuir diferentes segmentos de expansão, como as regiões D1, D2 e D3 (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Neste trabalho, ambos os genes nucleares apresentaram baixas porcentagens de sítios variados e parcimoniosos, semelhante ao observado por Souza (2013) ao analisar as famílias Pentatomidae e Coreidae. Contudo, esses dados diferem dos resultados de Li et al (2012), pois ao analisar os marcadores para sete infraordens de Heteroptera, verificou que o gene 18S apresentou 59,8% de sítios variados e 42,5% de sítios parcimoniosos em 1.982 pb, ao passo que o gene 28S exibiu 56,2% de sítios variados e 44,0% de parcimoniosos em 607 pb. As diferenças entre as sequências dos mesmos marcadores obtidas por Li et al (2012) em comparação a este estudo pode ser explicada por meio do tempo de divergência entre as espécies. Isto é, Li et al (2012) analisou diferentes espécies pertencentes a sete infraordens de Heteroptera, que possuem maior tempo de divergência e que podem ter acumulado mais polimorfismos em suas sequências ocasionando a maior porcentagem de variação em comparação as sequências do presente trabalho, visto que foram analisadas espécies de duas famílias, pertencentes a superfamílias distintas (Coreoidea e Pentatomoidea). Resultado semelhante ao de Li et al (2012) foi obtido por Tian et al (2008), uma vez que observaram 45,1% sítios variáveis e 29,2% parcimoniosos para o gene 18S e 50,7% sítios

variáveis e 31,4% parcimoniosos para o 28S ao analisar a filogenia molecular de 12 famílias de Cimicomorpha.

Nas análises também foram avaliadas a composição nucleotídica das sequências. Em ambos os marcadores foi observado maior porcentagem de bases CG, concordante com as análises de Souza (2013) para o gene 18S em Pentatomidae e Coreidae. O mesmo foi verificado por BARGUES et al (2000) ao sequenciar o gene 18S de triatomíneos, que apresentou um teor médio de bases de adenina e timina de 47,9% e, portanto, de 52,1% de citosinas e guaninas. Resultados concordantes foram obtidos por Li et al (2012), pois o gene 18S obteve 50,2% de CG ao passo que o gene 28S obteve um total de 54,3% dessas bases. Isso ocorre porque genes ribossomais nucleares têm, geralmente, quantidades equilibradas de bases AT/CG, diferente do que ocorre com genomas mitocondriais de insetos que tem tendência de bases AT, embora exceções sejam conhecidas (TARRIO et al, 2001).

Uma característica das sequências de DNA nuclear ribossômico é que elas evoluem mais lentamente do que genes mitocondriais (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Esse fato pode ser comprovado quando ao verificar a razão de mutações de transição e transversão para esses genes, visto que foram maiores que 1,0 para os marcadores 18S e 28S em análises individuais e concatenadas.

Razões de substituições de nucleotídeos igual ou superior a 1,0 sugerem que há maior número de mutações de transição ocorrendo em comparação a transversão para essas sequências (MATIOLI, 2004). Observações que seguem esse padrão também foram realizadas por Li et al (2012), pois em suas análises o gene 18S apresentou a razão transição/transversão (Ts/Tv) igual a 1,0, enquanto a do gene 28S foi de 1,1. Tian et al (2008) ao estudar a infraordem Cimicomorpha verificaram que para os genes 18S e 28S, bem como para as suas sequências concatenadas a razão Ts/Tv foi igual a 1,1.

A partir das análises realizadas foi possível observar a distância genética média de apenas 1,9% para as espécies analisadas a partir dos marcadores 18S e 28S em conjunto. Essa distância é muito baixa, provavelmente, devido à natureza conservada dos marcadores nucleares, visto que Souza-Firmino (2015) ao verificar a distância genética entre populações do percevejo *Pachycoris torridus* a partir do gene mitocondrial COI, verificou uma média de distância genética de 1,5%, contudo, a maior distância encontrada entre as populações analisadas foi de 2,5%. Além disso, Smith-Caldas et al (2001) ao analisar 15 espécies de Diptera verificou uma distância genética de 3,3%, evidenciando que valores acima de 3% são encontrados entre diferentes grupos taxonômicos.

Reconstrução filogenética

A reconstrução filogenética realizada para as espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae evidenciou que Pentatomidae constituiu um grupo monofilético, assim como foi verificado por Grazia et al (2008). A partir da análise das subfamílias de Pentatomidae, constatou-se que Asopinae se comportou como um grupo parafilético, diferindo dos resultados de Gapon e Konstantinov (2003) que a considera um grupo monofilético, com base em caracteres morfológicos bucais e de genitália masculina e o hábito predador. Segundo o autor essa subfamília é estreitamente relacionada à Pentatominae, o que pode ser constatado nos resultados obtidos, embora Asopinae também possa estar relacionada à Edessinae.

Discocephalinae, por sua vez, apresentou-se polifilética, diferentemente do encontrado por Rolston (1981), visto que segundo esse autor essa subfamília é um grupo monofilético. No entanto, de acordo com Campos e Grazia (2006) este táxon carece de estudos cladísticos para o melhor esclarecimento de sua posição taxonômica.

Edessinae não constituiu um grupo monofilético, corroborando os dados obtidos por Silva (2012) que ao estudar o gênero *Edessa*, embasada em caracteres morfológicos, constatou que não é monofilético. Segundo a autora, isto pode ocorrer porque este táxon possui um grande número de espécies descritas (aproximadamente 300 espécies) resultando em muitos problemas taxonômicos e nomenclaturais. Embora as análises do presente trabalho tenham concordado com Silva (2012), ela foi contrária a dados encontrados por Barcellos e Grazia (2003) e Silva (2004) que suportaram a monofilia da subfamília Edessinae e do gênero *Edessa*, respectivamente, com base em dados morfológicos.

Neste estudo Pentatominae e suas tribos não formaram grupos monofiléticos. De acordo com Campos e Grazia (2006) esta subfamília é merofilética (parafilética ou polifilética). Além disso, Pentatominae apresenta grandes problemas taxonômicos, visto que sua classificação em tribos não é concordante, pois segundo Schuh e Slater (1995) é constituída de oito tribos, ao passo que Grazia et al (1999) considera nove e Rider (2012) a divide em 42 tribos.

Em relação as tribos estudadas, nenhuma apresentou-se monofilética. Esses resultados corroboram alguns dados da literatura, como para Piezodorini e *Thyanta perditor* e *T. humilis*(*Incertae sedis*), que não obtiveram nenhum padrão de agrupamento como observado por Souza (2013) e Gomes (2013). Em nossa análise Nezarini não constituiu um grupo monofilético, corroborando os resultados obtidos por Ferrari (2009) que analisou esta tribo com base em caracteres morfológicos. As tribos Pentatomini e Carpocorini também não formaram agrupamentos monofiléticos, assim como observado por Souza (2013) que verificou suas parafilias com base nos genes 16S e 18S, individuais e concatenados, bem como por Gomes

(2013) ao analisar os genes *Cyt b*, COI, 16S, 18S e 28S em conjunto. Segundo Weiler (2011) a tribo Carporini não possui uma proposta formal de classificação, visto que não é baseada na definição de grupos monofiléticos, não sendo explicitados os caracteres que suportam esse agrupamento, o que dificulta saber seu real *status* taxonômico.

Dessa forma, a definição das tribos de Pentatominae é objeto de debates, pois poucas foram estudadas recentemente e muitas ainda necessitam de revisões (WALL, 2005), tornando seu estudo essencial para o melhor conhecimento deste táxon.

A família Coreidae, diferentemente de Pentatomidae, não constituiu um grupo monofilético, visto que as tribos Acantocephalini, Menenotini e uma espécie de Mictini agruparam-se externamente as duas famílias. A não formação de um clado para esta família é semelhante aos resultados encontrados por Gomes (2013) ao analisar 12 espécies de Coreidae e 13 de Pentatomidae utilizando os genes *Cyt b* e 28S. Contudo, diferem das topologias obtidas pela autora quando utilizou os genes COI, 16S e 18S separadamente e em conjunto, visto que nessas análises Coreidae constituiu um grupo monofilético. De acordo com Li (1996) essa família, assim como a subfamília Coreinae, constituem grupos monofiléticos, diferente do observado neste trabalho.

Ao analisar as tribos de Coreinae, foi verificado que Anisoscelidini e Coreini apresentaram-se polifiléticas, ao passo que Mictini comportou-se como parafilética. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza (2013) ao utilizar o gene 18S como marcador molecular para Anisoscelidini e Coreini. Gomes (2013) obteve dados concordantes, visto que em seu estudo não observou a formação de clados entre as espécies pertencentes às tribos Anisoscelidini, Acanthocerini, Chariesterini, Coreini e Leptoscelini. Segundo Gomes (2013) a não formação de grupos monofiléticos para estas tribos pode ser atribuída ao baixo número de representantes de cada uma delas, o que também pode explicar os nossos resultados, visto que de acordo com Li (1996) a família Coreidae, a subfamília Coreinae, bem como suas tribos, exceto Chariesterini, constituem grupos monofiléticos. Em relação às tribos Leptoscelini e Anisoscelidini foi verificado que as espécies *Dallacoris pictus* e *D. obscura* agruparam-se, com alto suporte, com as espécies *Leptoglossus gonagra* e *L. zonatus*, embora pertençam a tribos distintas. Esse resultado também foi verificado por Gomes (2013), ao analisar essas espécies utilizando os genes 18S, 28S, COI, *Cyt b* e 16S, ressaltando a importância de revisar o *status* taxonômico dessas espécies, a fim de confirmar sua classificação em suas respectivas tribos.

Para a construção de filogenias e cenários evolutivos confiáveis, além de um maior número de representantes de cada subfamília e tribo, outro fator importante é a escolha dos marcadores moleculares. Isso porque, os genes nucleares ribossômicos 18S e 28S, por

apresentarem alto grau de conservação, não são adequados para a reconstrução filogenética de baixos níveis taxonômicos e de espécies com divergência recente, como é o caso da infraordem Pentatomomorpha. De acordo com Yao et al (2012) o período geológico que compreende o Jurássico ao Cretáceo Inferior foram importantes para a evolução dos insetos Pentatomomorpha, visto que durante esse período os representantes de todas as superfamílias emergiram. Genes que codificam as subunidades menores dos ribossomos, como 16S e 18S (mitocondrial e nuclear) permitem a avaliação de relações evolutivas antigas (maiores que 100 milhões de anos). Um estudo realizado por Philippe et al (1994) verificou a taxa de evolução do gene 18S e concluiu que radiações adaptativas menores que 40 milhões de anos, estão, geralmente, fora dos limites de resolução do gene, não resultando em reconstruções filogenéticas muito robustas, porque sua taxa de substituição nucleotídica é relativamente lenta. De acordo com Mas-Coma e Bargues (2009) o gene 18S por possuir baixa taxa evolutiva não é muito útil para comparações de populações, subespécies e espécies próximas. Além disso, segundo Souza (2013) genes que apresentam poucos sítios variados, como foi observado, podem deixar relações filogenéticas não resolvidas.

É importante, portanto, que esses marcadores sejam utilizados aliados a outros, como mitocondriais ou genes codificadores de proteínas nucleares, para que possam produzir melhores resoluções sistemáticas (MALLATT et al, 2004).

Em nosso estudo, foi verificado, portanto, que os genes ribossomais nucleares 18S e 28S não são marcadores muito adequados para resoluções filogenéticas em nível de famílias, subfamílias e tribos, visto que os suportes dos ramos não permitem que haja confiabilidade nas análises, pois alguns grupos que são considerados monofiléticos, como as subfamílias de Pentatomidae, não tiveram sua monofilia resgatada, não reconstruindo, dessa forma, um cenário evolutivo robusto.

Problemas de classificação a níveis menos inclusivos como subfamílias e tribos, podem ocorrer graças à alta diversidade de táxons, bem como escassez de estudos em diferentes regiões do mundo (GAPUD, 1991), evidenciando a importância das pesquisas com esses grupos de espécies. A definição de grupos monofiléticos dentro de Pentatomidae e Coreidae são considerados de necessidade primária para a ampliação e aprofundamento do conhecimento sobre esse grupo de insetos (WEILER, 2011). Para tanto, são necessários mais estudos, abordando diferentes marcadores moleculares, em especial, genes mitocondriais, que por apresentarem maior taxa de evolução podem auxiliar no esclarecimento e suporte da classificação atual das relações intrafamiliares de Pentatomidae e Coreidae.

Legenda

Família Pentatomidae

- Subfamília Pentatominae
- Subfamília Asopinae
- Subfamília Discocephalinae
- Subfamília Edessinae

Família Coreidae

- Tribo Leptoscelini
- Tribo Anisoscelidini
- Tribo Coreini
- Tribo Mictini
- Tribo Acanthocerini
- Tribo Chariesterini
- Tribo Menenotini
- Tribo Acantocephalini

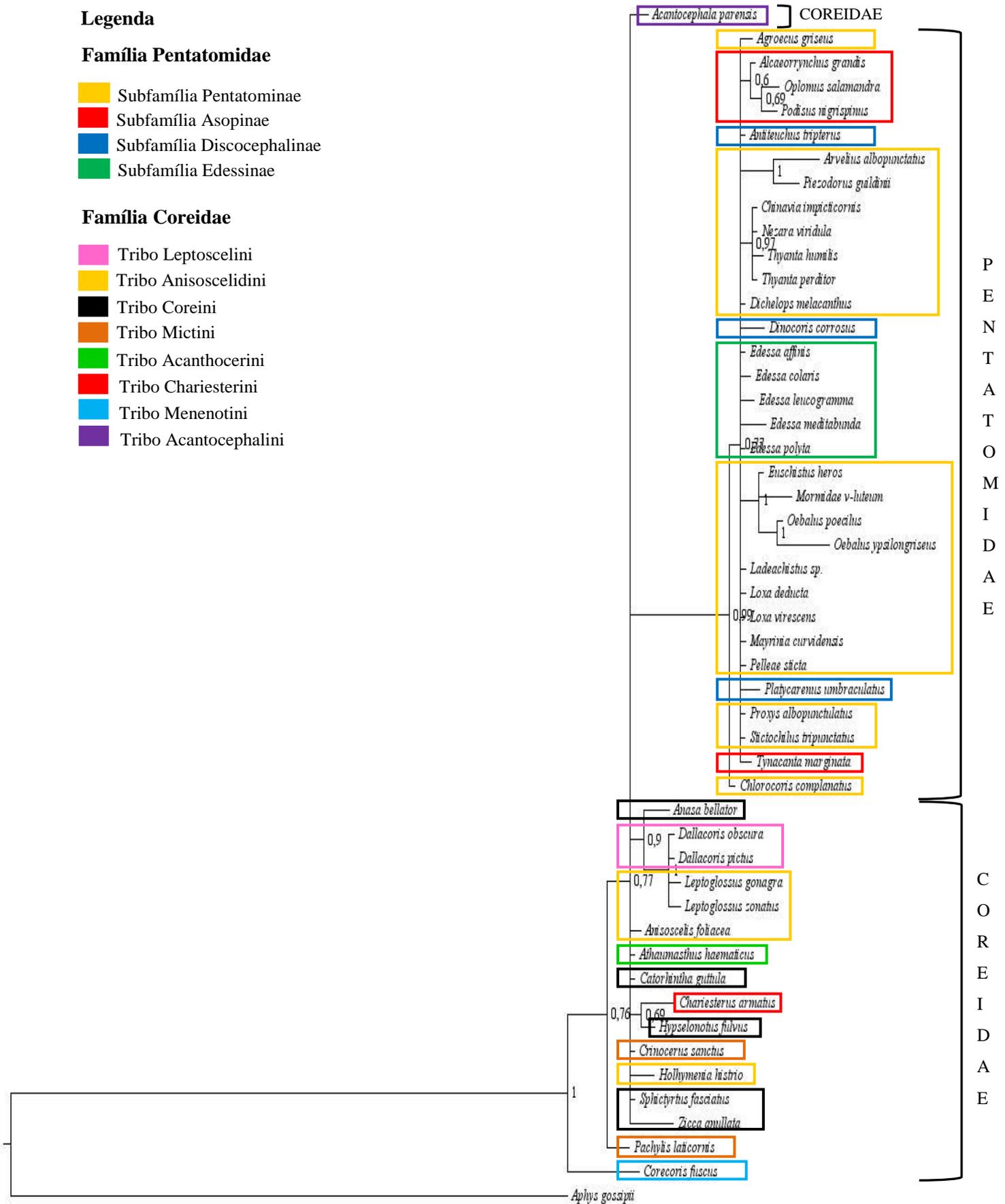


Figura 1. Árvore filogenética construída a partir do critério Inferência Bayesiana, utilizando os genes nucleares 18S e 28S em conjunto, implementada no programa MrBayes 3.1.

Agradecimentos

Aos Professores Doutores Jocélia Grazia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Luiz Antônio Alves Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro-Museu Nacional) e José Antônio Marin Fernandes (Universidade Federal do Pará) pelas identificações das espécies. A CAPES, FAPESP (processos 2010/16080-5, 2011/11054-5) e FAPERP pelos auxílios financeiros.

Referências

- ALDEA, A. F. F. Revisão de *Oenopiella* Bergroth, 1891 (Hemiptera, Pentatomidae, Carpocorini). 2013, p. 56 (Dissertação – Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2013.
- BARCELLOS, A.; GRAZIA, J. Cladistic analysis and biogeography of *Brachystethus* Laporte (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). **Zootaxa** v. 256, p. 1-14, 2003.
- BARGUES, M. D., MARCILLA, A., RAMSEY, J., et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.567–573, 2000.
- 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.
- CAMPOS, L. A.; GRAZIA, J. Análise cladística e biogeografia de Ochlerini (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, n. 2, p. 147-163, 2006.
- COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil – Hemípteros, 2º Tomo, Capítulo XXII**. Escola nacional de agronomia, série didática n. 3, 1940.
- ESCALANTE, A. A.; AYALA, F.J. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 5793-5797, 1995.
- FERRARI, A. Filogenia, biogeografia e revisão de *Nezara* Amyot & Serville, análise filogenética de Nezarini e áreas endêmicas de Pentatomidae na região Neotropical (Hemiptera, Heteroptera). P. 181, 2009. (Tese – Doutorado). Pós-graduação em Biologia Animal. Instituto de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2009.
- GAPON, D. A.; KONSTANTINOV F. V. On the Structure of the Aedeagus of Shield Bugs (Heteroptera, Pentatomidae): III. Subfamily Asopinae. **Entomological Review**, vol. 86, n. 7, p. 806–81, 2006.
- 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). **Philipp Entomol.** v. 8, p. 865-961, 1991.
- GOMES, M. O. 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. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Genética).

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013.

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, n. 6, p. 932-976, 2008.

GRAZIA, J., SCHWERTNER, C. F. Checklist dos percevejos-do-mato (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomoidea) do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop.*, vol. 11, 2011.

GRAZIA, J.; SCHWERTNER, C.F. Pentatomidae e Cyrtocorinae. Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. **Tucumán, Sociedad Entomologica Argentina**, v. 2, p. 223–234, 2008.

GRAZIA, J.; FERNANDES, J. A. M. ; SCHWERTNER, C. F. . Stysiana, a new genus and four new species of Pentatomini (Heteroptera: Pentatomidae). **Acta Societatis Zoologicae Bohemiae**, Praga, v. 63, p. 71-83, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 1999.

HENRY, T.J. Biodiversity of Heteroptera. **Insect biodiversity: science and society**, p. 223-263, 2009.

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

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees**. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754–755, 2001.

LI, H. M.; DENG, R. Q.; WANG, J. W. et al. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 2, p. 313-326, 2005

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

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

MALLATT, J. M.; GAREY, J. R.; SHULTZ, J. W. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 31, n. 1, p. 178-191, 2004.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta Trópica**. v. 110, n. 2, p. 112-136, 2009.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. ed. Holos, 2004.

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.

PACKAUSKAS, R. **Catalog of the Coreidae, or Leaf-Footed Bugs, of the New World**. Fort Hays Studies, Fourth Series, n. 5, 2010.

PALL, J. L.; COSCARÓN, M. C. Synopsis of Acanthocerini (Hemiptera, Coreidae) from Argentina. **ZooKeys**, n. 305, p. 33–53, 2013.

PHILIPPE, H.; CHENUIL, A.; ADOUTTE, A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? **Development**, p. 15–25, 1994.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

RIDER, D. A. (2012) Pentatomoidea Home pag-North Dakota State University. Disponível em <http://www.ndsu.edu/ndsu/rider/Pentatomoidea/Researchers/Rider_David.htm> (acessado em 15 de outubro de 2015).

ROLSTON, L. H. Ochlerini, a new tribe in Discocephalinae (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 89, n. 1, p. 40-42, 1981.

ROLSTON, L.H. Key and diagnoses for the genera of Ochlerini (Hemiptera: Pentatomidae: Discocephalinae. **J. N. Y. Ent. Soc**, v. 100, n. 1, p.1-41, 1992.

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. **True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History)**. Cornell University Press, 1995.

SILVA, E. J. E. Revisão do Grupo *E. rufomarginata* do gênero *Edessa* Fabricius, 1803 (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2004.

SILVA, V. J. Análise cladística e descrição de um grupo novo de espécies de *Edessa* (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia). **Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, 2012.

SMITH-CALDAS, M. R. B.; MCPHERON, B.A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the fraterculus group (Anastrepha: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotrop Entomol.** V. 30, p. 565-573, 2001.

SOUZA, H. V. Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S, 2013 138 f. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013.

SOUZA-FIRMINO, T. S. Estudo Intra e Interpopulacional de *Pachycoris torridus* (Scopoli, 1772) (Heteroptera: Scutelleridae). 2015, 100 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARRIO, R.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F.J.; Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. **Mol. Biol. Evol.** V. 18, p. 1464–1473, 2001.

TIAN, Y.; ZHU, W.; LI, M. et al. Influence of data conflict and molecular phylogeny of major clades in Cimicomorphan true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 581-597, 2008.

WALL, M. A. Phylogenetic relationships among Halyini (Pentatomidae: Pentatominae) genera based on morphology, with emphasis on the taxonomy and morphology of the *Solomonius*-group. Tese de Doutorado, **University of Connecticut**, 2005.

WEILER, L. M. Análise cladística e descrição de uma nova espécie para o subgênero *Lycipta* Stål, 1982 (Hemiptera, Pentatomidae, Carpocorini, *Euschistus*), 2011 p. 108 (Dissertação – Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2011.

WEIRAUCH, C., SCHUH, R.T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annu Rev Entomol.**; 56: 487-510, 2011.

YAO, Y., REN, D., RIDER, D. A., CAI, W. Phylogeny of the infraorder Pentatomomorpha based on fossil and extant morphology, with description of a new fossil family from China. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.

ARTIGO II

Análise filogenética das subfamílias Edessinae, Pentatominae e Discocephalinae (Heteroptera, Pentatomidae) a partir dos genes mitocondriais 16S e ND5 e nucleares 18S e 28S

Banho, C. A.; Gome, M. O., Almeida, C. A., Itoyama, M. M.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Câmpus São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos.

Rua Cristóvão Colombo, 2265

Jardim Nazareth

CEP:15054-000

São José do Rio Preto, SP

ce_artico@hotmail.com

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial informativo e variabilidade genética das sequências parciais dos genes mitocondriais 16S e ND5 e nucleares 18S e 28S para espécies de percevejos terrestres, pertencentes à família Pentatomidae, bem como inferir e comparar o relacionamento filogenético existente entre as subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae e suas respectivas tribos. Essa família possui 163 espécies distribuídas em 71 gêneros no Estado de São Paulo, sendo importantes economicamente, visto que, muitas são consideradas pragas agrícolas devido ao hábito fitófago, afetando diretamente culturas importantes para o consumo humano. Apesar de sua diversidade taxonômica, estudos cladísticos com abordagem molecular são escassos para essa família. Sendo assim, no presente trabalho, por meio de análises estatísticas e filogenéticas a partir de marcadores mitocondriais e nucleares, foram avaliadas 18 espécies, sendo 17 pertencentes à Pentatomidae e uma à Coreidae (*outgroup*). A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que os genes mitocondriais apresentaram alta porcentagem de bases AT, e alta porcentagem de polimorfismos, diferente do observado para as sequências dos genes nucleares 18S e 28S que mostraram porcentagens equilibradas de bases AT

e CG, assim como menor quantidade de mutações pontuais de transição e transversão. A partir da análise filogenética com os genes concatenados, houve a confirmação do monofiletismo das tribos Edessini, Carpocorini e Nezarini. A subfamília Discocephalinae mostrou-se mais relacionada à Edessinae, enquanto que Piezodorini e *T. perditor* apresentaram-se proximamente relacionados com as espécies de Nezarini. A tribo Pentatomini da subfamília Pentatominae apresentou-se polifilética, com suas espécies se posicionando externamente as demais subfamílias analisadas, evidenciando a necessidade de utilizar maior número de marcadores, bem como maior número de espécies, principalmente dentro de cada tribo, a fim tentar resolver as inconsistências ainda presentes, assim como caracterizar a história evolutiva desse grupo.

Palavras-chave: Pentatomomorpha, Pentatomoidea, análise cladística

Introdução

Hemiptera é o quinto maior grupo de artrópodes, com aproximadamente 82.000 espécies descritas (CRYAN; URBAN, 2012), sendo composta por quatro subordens, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha e Heteroptera (FORERO, 2008), constituindo um dos grupos mais bem sucedidos e numerosos entre os hemimetabolos, que tem a sua monofilia reconhecida e embasada em estruturas bucais específicas da mandíbula e da maxila (FORERO, 2008).

Dentre as subordens de Hemiptera, Heteroptera é o maior e mais diverso grupo, com aproximadamente, 80 famílias (SCHUH; SLATER, 1995) e 40.000 espécies descritas (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Com base em evidências morfológicas e moleculares, muitos autores assumem Heteroptera como um grupo monofilético (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Contudo, algumas relações permanecem incertas entre determinados organismos de níveis taxonômicos menores. Devido a esse fato, análises filogenéticas nos mais diversos níveis taxonômicos vêm sendo realizadas, levando a compreensão de sua sistemática nos últimos 25 anos (WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Dentre as pesquisas que tem auxiliado no esclarecimento das relações filogenéticas do grupo, pode-se destacar o estudo das subordens de Hemiptera (Heteroptera, Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha) por meio de genomas mitocondriais (LEE et al, 2009), a análise das relações entre sete Infraordens de Heteroptera, a partir dos genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e COI (LI et al, 2012), análise filogenética de 32 espécies da Infraordem Nepomorpha, a partir de genomas mitocondriais (HUA et al, 2009), e estudos filogenéticos entre os grupos que compõem

a Infraordem Cimicomorpha, a partir dos genes 18S, 28S e 16S (TIAN et al, 2008). Além disso, pode-se destacar o estudo de níveis taxonômicos mais inclusivos, como a análise realizada por Grazia et al (2008) que verificou as relações entre as famílias de Pentatomoidea, utilizando os genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e COI aliados a caracteres morfológicos. Estudos a níveis de famílias, subfamílias e tribos também vêm sendo realizados e tem auxiliado no esclarecimento da evolução de Heteroptera. Forero (2013) estudou a relações filogenéticas da família Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) a partir de dados morfológicos e dos genes 18S, 28S, 16S, COI e *Cyt b*, ao passo que Ceretti-Junior et al (2008) estudou a subfamília Triatominae (Reduviidae) utilizando o gene mitocondrial ribossomal 16S e Gardim (2014) verificou as relações filogenéticas entre membros do subcomplexo *Triatoma brasiliensis*, pertencentes à tribo Triatomini, da família Reduviidae, por meio dos genes mitocondriais *Cyt b*, COI e 16S.

Embora haja grande número de análises, com exemplares da subordem Heteroptera, ainda existem muitos grupos que necessitam de estudos sistemáticos. Segundo Weiler (2011) a definição e o estudo de grupos monofiléticos dentro de Pentatomidae são de necessidade primária para a ampliação do conhecimento do grupo.

A família Pentatomidae corresponde a quarta maior e mais diversa dentre os heterópteros, incluindo cerca de 4.500 espécies descritas e, de acordo com Grazia et al (2008) é composta por dez subfamílias, dentre as quais estão representadas na região Neotropical Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae e Strotarsinae. No Estado de São Paulo, todas as subfamílias, com exceção de Strotarsinae, possuem representantes, totalizando 163 espécies (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). Apesar da monofilia de Pentatomidae ser bem suportada por caracteres morfológicos e moleculares, ainda existem muitos problemas de classificação ao nível de subfamílias e tribos, as quais nunca foram testadas por dados moleculares.

Diversos trabalhos envolvendo análises cladísticas a partir de caracteres morfológicos vêm sendo realizados por alguns autores como Barcellos e Grazia (2003), Fortes e Grazia (2005), Grazia et al (2008), ocasionando um avanço considerável no conhecimento desse grupo no Brasil, permitindo uma melhor estimativa de sua diversidade, assim como a compreensão de sua evolução na região Neotropical. Contudo, trabalhos com diferentes abordagens devem ser realizados para estabelecer cenários evolutivos mais robustos, corroborar as classificações atuais e auxiliar no conhecimento da fauna de heterópteros brasileiros.

Portanto o presente estudo teve como objetivo confirmar a monofilia das subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae a partir dos genes mitocondriais 16S e ND5 e nucleares 18S e 28S, assim como analisar a variabilidade genética presente em suas sequências.

Material e métodos

Foram analisadas 17 espécies, pertencentes à família Pentatomidae e uma espécie de Coreidae (*Leptoglossus gonagra*) utilizada com grupo externo, listadas na Tabela 1. As espécies foram coletadas na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W) e fixadas em etanol absoluto. Algumas espécies possuíam sequências dos genes utilizados no presente estudo depositados no banco de dados do NCBI, do qual foram retiradas para a realização das análises. As espécies que não possuíam sequências de DNA na literatura foram submetidas à extração do material genético e, posteriormente, à reação de PCR para amplificação dos fragmentos desejados.

A extração de DNA foi realizada a partir de fragmentos da musculatura torácica utilizando *Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit* (GE healthcare).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações em cadeia da polimerase foram *forward* 5'-CCGGTTTGAAGTCAGATCATGT-3 e *reverse* 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3, para o gene 16S (SIMON et al, 1994) e *forward* 5'-CCTGTTTCTGCWTRGTTTCATTCTTC-3' e *reverse* 5'-YAGGATAAGGAAAAATTAATCA-3' para o gene ND5, desenhado a partir do programa *Geneious R6*. Para o fragmento gênico nuclear 18S o par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram *forward* 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3' e *reverse* 5'-CTGAGATCCAACACTACGA GCTT -3 (BARGUES; MAS-COMA, 1997) e para o gene 28S foi utilizado *forward* 5'-CCCGTCTTGAAACACGGACCAA-3 e *reverse* 5'-CCACAGCGCCAGTTCTGCTTAC-3 (MURAJI; TACHIKAWA, 2000).

As amplificações foram realizadas em *termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler* em um volume total de reação de 15 µL, utilizando 100 ng de DNA; 0,3 µL a 10 mM de cada par de oligonucleotídeo; 0,3 µL a 100 mM de dNTP; 1,5 µL de buffer, 0,44 µL a 50 mM de MgCl₂ e 0,06 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Os ciclos para amplificação utilizados seguiram as indicações do fabricante (*Platinum Taq DNA Polymerase*), com as temperaturas de anelamento adequadas para cada par de oligonucleotídeo iniciador, sendo 48°C para o gene 16S, 50 para o ND5, 50 para o gene 28S e 52 para o 18S.

Os produtos de PCR foram purificados, utilizando kit “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”, seguindo o protocolo que o acompanha, sem modificações. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, de acordo com o protocolo para Mega BACE 1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*). As sequências obtidas serão depositadas, posteriormente, no banco de dados do NCBI.

A validação das sequências foi verificada após sua submissão à ferramenta *Nucleotide-Blast* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A partir das sequências *forward* e *reverse* construíram-se sequências consensos, as quais foram utilizadas nas análises filogenéticas. As regiões gênicas amplificadas foram alinhadas por meio “*ClustalW Multiple Alignment*” do “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.9.0*” (HALL, 1999). Para a escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica foi utilizado o programa JModelTest (POSADA, 2008), seguindo o critério AIC (*Akaike information criterion*) resultando no modelo GTR+I+G para as sequências 18S, 28S, 16S e ND5, que foi utilizado para a análise de Inferência Bayesiana. No Programa MEGA 6.0 (TAMURA et al, 2013) foram realizadas análises estatísticas de composição de bases e de polimorfismos para cada conjunto de dados, isto é, para cada gene separado, bem como para as sequências concatenadas. A análise de Inferência Bayesiana foi implementada no programa MrBayes 3.1 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) utilizando os genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e ND5 em conjunto. Foram realizadas duas corridas independentes, quatro cadeias de MMCC e dois milhões de gerações corridas. O *burn-in* obtido foi de 25%. O suporte nos ramos corresponde a bootstrap de 100%, sendo mostrados apenas os que obtiveram valores acima de 50%.

Tabela 1. Classificação taxonômica e números de acessos das espécies das subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae de Pentatomidae utilizadas no presente estudo.

Família	Subfamília	Tribos	Espécies	Sequências				
				18S	28S	16S	ND5	
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	<i>Leptoglossus gonagra</i> (Fabricius, 1775)	KC537009	KC796318	KC537016	Presente trabalho	
Pentatomidae	Discocephalinae	Discocephalini	<i>Antiteuchus tripterus</i> (Fabricius, 1787)	KC537045	KC796334	KC537020	Presente trabalho	
			Edessinae	<i>Edessa affinis</i> (Dallas, 1851)	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho
				<i>Edessa mediatubunda</i> (Fabricius, 1794)	KC537048	KC796337	KC537023	Presente trabalho
	<i>Edessa leucogramma</i> (Perty, 1833)	Presente trabalho		Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho		
	<i>Edessa polyta</i> (Lepelletier & Serville, 1825)	Presente trabalho		Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho		
	Pentatominae	Carpocorini	<i>Dichelops melacanthus</i> (Dallas, 1851)	KC537047	KC796339	KC537022	Presente trabalho	
			<i>Euschistus heros</i> (Fabricius, 1794)	KC537049	KC796340	KC537024	Presente trabalho	
			<i>Ladeachistus</i> sp.	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho	
			<i>Mormidea v-luteum</i> (Lichtenstein, 1796)	KC537051	KC796342	KC537026	Presente trabalho	
			<i>Oebalus ypsilongriseus</i> (De Geer 1773)	KC537053	KC796345	KC537028	Presente trabalho	
			<i>Oebalus poecilus</i> (Dallas, 1851)	KC537052	KC796344	KC537027	Presente trabalho	
			<i>Proxys albopunctulatus</i> (Palisot de Beauvois, 1805)	KC537056	KC796349	KC537031	Presente trabalho	
			Nezarini	<i>Chinavia impicticornis</i> (Stål, 1872)	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho
	<i>Nezara viridula</i> (Linnaeu, 1758)	Presente trabalho		Presente trabalho	Presente trabalho	Presente trabalho		
	Chlorocorini	Chlorocorini	<i>Chlorocoris complanatus</i> (Guerin-Meneville, 1831)	KC537046	KC796347	KC537021	Presente trabalho	
<i>Loxa deducta</i> (Walker, 1867)			KC537050	KC796348	KC537025	Presente trabalho		
Piezodorini	Piezodorini	<i>Piezodorus guildinii</i> (Westwood, 1837)	KC537054	KC796353	KC537029	Presente trabalho		
Incertae sedis	Incertae sedis	<i>Thyanta perditor</i> (Fabricius, 1794)	KC537057	KC796351	KC537032	Presente trabalho		

Resultados

Estatística descritiva e composição nucleotídica

A partir das análises das sequências obtidas para as espécies da família Pentatomidae, pode-se verificar que os genes ribossomais nucleares 18S e 28S apresentaram alto grau de conservação, e conseqüentemente, baixa porcentagem de sítios de variados e parcimoniosos (Tabela 2). Ao se analisar os marcadores nucleares foi verificado maior porcentagem de bases CG, em comparação a bases AT (Tabela 2). Outro dado importante está relacionado à proporção de mutações nas sequências, visto que para o marcador 18S foi observado um total de 532 transições e uma transversão. Dados semelhantes foram obtidos para o gene 28S, visto que a quantidade de mutações de transição visualizadas foi de 356 ao passo que foi verificada apenas uma mutação de transversão. Como consequência, o alto grau de conservação, a grande quantidade de mutações de transições em comparação com transversões e o conteúdo de bases citosina e guanina acima de 50% se mantiveram quando ambos os genes nucleares foram concatenados.

Os dados obtidos a partir dos marcadores moleculares mitocondriais apresentaram-se opostos aos nucleares, pois os fragmentos gênicos 16S e ND5 mostraram alta porcentagem de sítios variados e parcimoniosos (Tabela 2). Esses marcadores obtiveram alta porcentagem de bases AT em comparação a CG, diferindo das sequências gênicas nucleares analisadas (Tabela 2). Outro dado relevante e distinto dos marcadores nucleares está relacionado às proporções de mutações de transição e transversão. Para o fragmento gênico 16S as sequências analisadas mostraram 327 transições e 24 transversões ao passo que o gene ND5, que diferentemente dos demais marcadores é codificante de proteína, apresentou diferentes quantidades de mutações de transição e transversão para cada base do códon. Isto é, a primeira base do códon exibiu 20 mutações de transição e 13 de transversão, a segunda base apresentou 17 transições e 11 transversões ao passo que na terceira base foi verificado 26 transições e 22 transversões.

Quando se analisou as sequências dos marcadores mitocondriais e nucleares em conjunto pode-se verificar que os marcadores mitocondriais influenciaram de maneira mais eficaz, devido ao viés de bases AT, da maior quantidade de sítios variáveis e parcimoniosos, bem como as proporções de mutações observadas.

Ao verificar a matriz de distância obtida para os marcadores moleculares concatenados, foi observada distância genética média relativamente alta para espécies da mesma família, sendo

ela de 9,8%. A maior distância genética observada foi de 11,6% ao passo que a menor foi de 4,4% (Tabela 3).

Tabela 2. Estatística descritiva das sequências dos genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e ND5 para as espécies analisadas no presente estudo.

Composição Nucleotídica	Fragmento gênico 18S	Fragmento gênico 28S	Fragmento gênico 16S	Fragmento gênico ND5	Fragmentos gênicos 28S + 18S	Fragmentos s gênicos 16S + ND5	Fragmentos gênicos 18S + 28S + 16S + ND5
Comprimento (pb)	542	363	427	515	903	942	1844
N. sítios Conservados	511 (94,2%)	341 (94%)	212 (49,6%)	211 (40,9%)	852 (94,3%)	423 (44,9%)	1275 (69,1%)
N. sítios Variáveis	25 (4,6%)	18 (4,95%)	202 (47,3%)	299 (58%)	43 (4,7%)	501 (53,1%)	544 (29,5%)
N. sítios Parcimoniosos	5 (0,92%)	3 (0,82%)	149 (34,9%)	218 (42,3%)	8 (0,88%)	367 (38,95%)	375 (20,3%)
N. sítios Únicos	20 (3,7%)	15 (4,1%)	52 (12,2%)	80 (15,5%)	35 (3,8%)	132 (14%)	167 (9%)
%AT	48,3	44,9	72,3	75,4	47,0	74	60,6
%CG	51,7	55,1	51,4	24,6	53,0	26	39,4
Si/Sv	2,0	1,0	44	63,0	4,0	107,0	111,0

Reconstrução filogenética

Na topologia obtida para os genes 18S, 28S, 16S e ND5 concatenados foi observado ao analisar as relações das tribos e subfamílias de Pentatomidae, que a tribo Edessini, pertencente à subfamília Edessinae compôs um grupo monofilético com alto suporte nos ramos (Figura 1). A subfamília Discocephalinae, que está representada pela espécie *Antiteuchus tripterus* (Discocephalini), agrupou-se externamente a Edessini, com alta confiabilidade nos ramos (Figura 1). As espécies *Thyanta perditor* (*Incertae sedis*) e *Piezodorus guildinii* (Piezodorini) agruparam-se externamente à tribo Nezarini com alto *bootstrap* (Figura 1).

A subfamília Pentatominae, composta pelas tribos Nezarini, Piezodorini, *T. perditor*, Carpocorini e Pentatomini, constituiu um grupo polifilético. A tribo Nezarini apresentou-se monofilética ao passo que Pentatomini constituiu um grupo parafilético, pois as espécies *Chlorocoris complanatus* e *Loxa deducta*, se agruparam externas às demais subfamílias de Pentatomidae. A tribo Carpocorini, por outro lado, constituiu um grupo monofilético para esse conjunto de dados (Figura 1).

Discussão

Estatística descritiva e composição nucleotídica

Os resultados obtidos nas análises de composição nucleotídica e variabilidade das sequências demonstraram grandes diferenças entre os marcadores escolhidos. Isto é, os genes nucleares ribossomais 18S e 28S apresentaram sequências com baixa porcentagem de sítios variados e parcimoniosos, composição de bases com maior teor de CG, e razão de mutações de transição e transversão obtidas para os genes 18S e 28S maiores que 1,0. Esses resultados estão de acordo com informações encontradas na literatura, corroborando assim a natureza conservada dessas sequências. Souza (2013) ao estudar as relações intrafamiliares de Coreidae e Pentatomidae, verificou que o gene 18S apresentou 97,22 e 97,10% de sítios conservados, respectivamente. Consequentemente, para esse mesmo fragmento foi observado baixa quantidade de sítios variados, sendo de 0,02% para Pentatomidae e 0,03% para Coreidae, assim como verificado para as espécies da família Pentatomidae analisadas no presente estudo.

Os resultados obtidos em relação à porcentagem de CG são semelhantes ao observado por Souza (2013) para o gene 18S em espécies de Pentatomidae e por Li et al (2012) ao analisar a variabilidade das sequências e relações filogenéticas de sete infraordens de Heteroptera. O mesmo também foi verificado por BARGUES et al (2000) ao analisar o gene 18S de triatomíneos. De acordo com TARRIO et al (2001) genes ribossomais nucleares tem, geralmente, composição de bases menos tendenciosas a adenina e timina, embora exceções sejam conhecidas.

Os marcadores gênicos nucleares utilizados neste estudo apresentaram baixa razão de mutações de transição e transversão (Ts/Tv). Os dados observados foram concordantes aos obtidos por Li et al (2012), visto que em suas análises o gene 18S mostrou Ts/Tv igual a 1,0, ao passo que para o gene 28S foi de 1,1. Essas razões podem ser explicadas pelo fato de que as sequências de DNA nuclear ribossômico, geralmente, evoluem mais lentamente do que genes mitocondriais (MAS-COMA; BARGUES, 2009), acumulando dessa forma um menor número de mutações ao longo do tempo. Outro fato interessante é que essas sequências exibem maior número de mutações de transição, em relação às transversões, o que pode ser explicado devido ao eficiente mecanismo de reparo do DNA nuclear, o qual detecta mais facilmente transversões, visto que causam maiores disrupções na dupla hélice do DNA (FREEMAN; HERRON, 2009).

Os dados obtidos para os marcadores moleculares mitocondriais apresentaram-se opostos aos nucleares em todos os parâmetros estudados, visto que os fragmentos gênicos 16S e ND5 se mostraram altamente variáveis e com alta porcentagem de sítios parcimoniosos. Esses valores estão de acordo com informações obtidas por Li et al (2012) para o gene 16S, pois os autores

observaram 76,2% de sítios variados e 65,5% de sítios informativos ao estudarem as infraordens de Heteroptera. Dados semelhantes foram obtidos por Yeh et al (2005) ao analisar o gene 16S para espécies da superfamília Fulgoroidea (Hemiptera, Alcaenorrhyncha) e por Tian et al (2008) ao estudar a infraordem Cimicomorpha. Souza (2013) ao verificar as relações das espécies da família Pentatomidae a partir dos genes mitocondriais 16S e COI e nuclear 18S concatenados verificou 63,13% de nucleotídeos AT, semelhante ao que ocorre para as sequências gênicas 18S, 28S, 16S e ND5 concatenadas.

É sabido que o genoma mitocondrial de percevejos tem padrão semelhante aos encontrados para a maioria dos genomas mitocondriais de Hexapoda, correspondendo a uma inclinação positiva para bases AT e negativas para GC. Essa característica, segundo Yuan et al (2015) pode ser específica para determinados grupos taxonômicos e, portanto, utilizadas como marcadores genéticos para análises evolutivas e populacionais de Heteroptera.

Neste, os genes ND5, 16S, apresentaram valores maiores que 70% de bases AT. Esses dados são corroborados por Yeh et al (2005) ao estudar as relações de Fulgoroidea (Hemiptera), onde encontrou 73,7% de bases AT em seu genoma mitocondrial. Valores maiores que 70% também foram encontrados para o gene 16S para estas bases em análises das infraordens de Heteroptera (LI et al, 2012), bem como apenas para Cimicomorpha (infraordem de Heteroptera) (TIAN et al, 2008). O enviesamento para bases de adenina e timina em genomas mitocondriais de artrópodes também foi verificado por Yuan et al (2015) evidenciando que sequências que compõem o material genético mitocondrial, geralmente, são ricas em A+T, podendo variar de 70,4% em *Megacopta cribraria* (Plataspidae) a 76,9% em *N. viridula* (Pentatomidae). Em triatomíneos a sequência completa do ND1 apresentou conteúdo de bases AT entre 68,8 e 73,3%, semelhante com o que ocorre com o gene ND5 analisado para Pentatomidae (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Os resultados obtidos evidenciaram que os genes mitocondriais apresentaram elevadas razões de mutações transição/transversão. Esse resultado se mostrou diferente do encontrado por Tian et al (2008), visto que para o gene 16S a Ts/Tv obtida foi de 0,5, indicando que as espécies analisadas possuíam mais transversões. Isto foi verificado também quando os autores concatenaram os genes 18S, 28S e 16S, pois a razão Ts/Tv observada foi de 0,8 ao passo que quando analisaram apenas os genes 18S e 28S em conjuntos obtiveram uma razão de mutação de 1,1, indicando que para essas sequências ocorreram mais transições. Semelhante aos dados de Tian et al (2008), Li et al (2012) verificaram que para suas sequências, os genes mitocondriais 16S e COI apresentaram Ts/Tv de 0,5 e 0,7, respectivamente. Souza (2013) observou que para as sequências dos genes 18S+16S+COI das famílias Coreidae e Pentatomidae a Ts/Tv foi de 1,0 e

0,92, respectivamente. Embora nossos dados não tenham sido semelhantes aos encontrados por outros autores, em relação à proporção de mutações, constatamos que os genes mitocondriais demonstraram maior quantidade de transversões quando comparados aos genes nucleares.

Nas análises realizadas observou-se a distância genética média de 9,8% para as espécies analisadas a partir dos marcadores nucleares e mitocondriais em conjunto. Essa distância é alta e concorda com dados obtidos por Smith-Caldas et al (2011), que verificou uma distância maior que 3% em espécies diferentes de Diptera, assumindo que distâncias genéticas acima desse valor são encontradas em táxons distintos.

Reconstrução filogenética

A família Pentatomidae, atualmente é bem estabelecida como grupo monofilético, com base em caracteres morfológicos e moleculares. Contudo, a classificação de suas subfamílias e tribos ainda é pouco fundamentada em hipóteses filogenéticas (Grazia et al, 2008).

A partir da topologia construída pelo método de Inferência Bayesiana, para os marcadores nucleares aliados aos mitocondriais foi verificado que a subfamília Edessinae constituiu um grupo monofilético com alta confiabilidade nos ramos (*bootstrap* de 100%), corroborando os resultados de Barcellos e Grazia (2003), que confirmaram o monofiletismo dessa subfamília por meio de caracteres morfológicos. Silva (2012) ao analisar espécies do gênero *Edessa* constatou que esse táxon não é um grupo monofilético, com base em caracteres morfológicos. Todavia, Silva (2004) ao analisar o grupo *Edessa rufomarginata* verificou que esse gênero constitui um grupo monofilético, também com base em caracteres morfológicos. O presente trabalho obteve um padrão semelhante ao encontrado por Silva (2004) e por Barcellos e Grazia (2003), visto que esse gênero e essa subfamília podem ser considerados monofiléticos.

A subfamília Discocephalinae, representada por *Antiteuchus tripterus* (Discocephalini), agrupou-se próxima das espécies de Edessinae, na análise realizada. Este resultado corrobora os dados obtidos por Gomes (2013) ao analisar espécies de Pentatomidae para os genes 16S, COI e *Cyt b* em conjunto, indicando que essas subfamílias podem ser mais relacionadas entre si.

A subfamília Pentatominae é a mais numerosa de Pentatomidae, contudo apresenta grandes problemas de classificação, visto que alguns autores a dividiram em oito (Schuh; Slater, 1995), nove (Grazia et al, 1999) ou 42 tribos (Rider, 2012).

Campos e Grazia (2006) sugeriram, com base em caracteres morfológicos, que Pentatominae é merofilética (parafilética ou polifilética) visto que ao analisarem *Janeirona* (Pentatomini) e representantes da tribo Halyini, ambos pertencentes a essa subfamília, verificaram que as espécies em questão não constituíram um grupo monofilético, assim como foi

observado em nossa análise. Sendo assim, sugeriram que apenas com estudos cladísticos abrangentes de Pentatomidae seria possível aproximar-se melhor das corretas relações filogenéticas entre as subfamílias e tribos. De acordo com Wall (2005) a definição das tribos de Pentatominae é objeto de debates, pois poucas foram estudadas recentemente e muitas ainda necessitam de revisões.

No presente trabalho foram analisadas as tribos Nezarini, Piezodorini, *T. perditor* (*Incertae sedis*), Carpocorini e Pentatomini de Pentatominae. A partir dos resultados obtidos foi verificado que as espécies *Tyanta perditor* e *Piezodorus guildinii*, agruparam-se externamente a tribo Nezarini com alto suporte nos ramos, indicando que estas espécies podem ser relacionadas. Contudo, pelo fato de ter sido analisado apenas uma espécie do gênero *Tyanta* e por Piezodorini ser classificada com apenas uma espécie não se pode afirmar suas corretas relações, tornando estudos envolvendo esses táxons necessários.

A tribo Nezarini apresentou-se monofilética, com alto suporte, em nossas análises. Este resultado difere do encontrado por Ferrari (2009) ao analisar esta tribo, visto que o autor não corroborou sua monofilia com base em caracteres morfológicos.

Pentatomini apresentou um padrão muito distinto das demais tribos da subfamília Pentatominae, visto que as espécies estudadas que as constitui, *Loxa deducta* e *Chlorocoris complanatus*, não formaram um clado e ambas se posicionaram externamente a todas as subfamílias analisadas. Esse resultado indica que a subfamília Pentatominae não é um grupo monofilético, como sugerido por Campos e Grazia (2006) e, principalmente que as espécies *L. deducta* e *C. complanatus* necessitam ter seu *status* taxonômico revisto, a fim de confirmar se ambas pertencem Pentatominae e, conseqüentemente, a tribo Pentatomini.

Carpocorini apresentou-se como monofilética, com alto suporte nos ramos. Contudo esse táxon apresenta, ainda, grandes problemas taxonômicos, visto que não possui uma proposta formal de classificação baseada na definição de grupos monofiléticos, não sendo explicitados os caracteres que suportam esse agrupamento. Hasan e Kitching (1993) a incluiu em suas análises, contudo sua posição filogenética possuiu pouco suporte com base nos caracteres utilizados. Souza (2013) ao analisá-la a partir dos genes 16S e 18S individuais e concatenados pelos métodos de Neighbor-joining e Inferência Bayesiana, constatou sua parafilia, entretanto ao incluir os genes COI (regiões 1 e 2) verificou que essa tribo se comportou como monofilética. Gomes (2013) ao analisar os genes *Cyt b*, COI, 16S, 18S e 28S concatenados para espécies de Pentatomidae, observou que Carpocorini constituiu um grupo parafilético.

Problemas de classificação em níveis menos inclusivos como subfamílias e tribos, podem ocorrer graças à alta diversidade de táxons, bem como escassez de estudos em diferentes regiões

do mundo (GAPUD, 1991), evidenciando a importância das pesquisas com esses grupos de espécies. A definição de grupos monofiléticos dentro de Pentatomidae são considerados de necessidade primária para a ampliação e aprofundamento do conhecimento sobre esse grupo de insetos (WEILER, 2011). E, por este motivo, mais análises devem ser realizadas, utilizando mais espécies, assim como caracteres moleculares aliados a morfológicos, a fim de se obter maior robustez e, conseqüentemente, confiabilidade nas análises obtidas, esclarecendo dessa forma a história evolutiva deste complexo grupo.

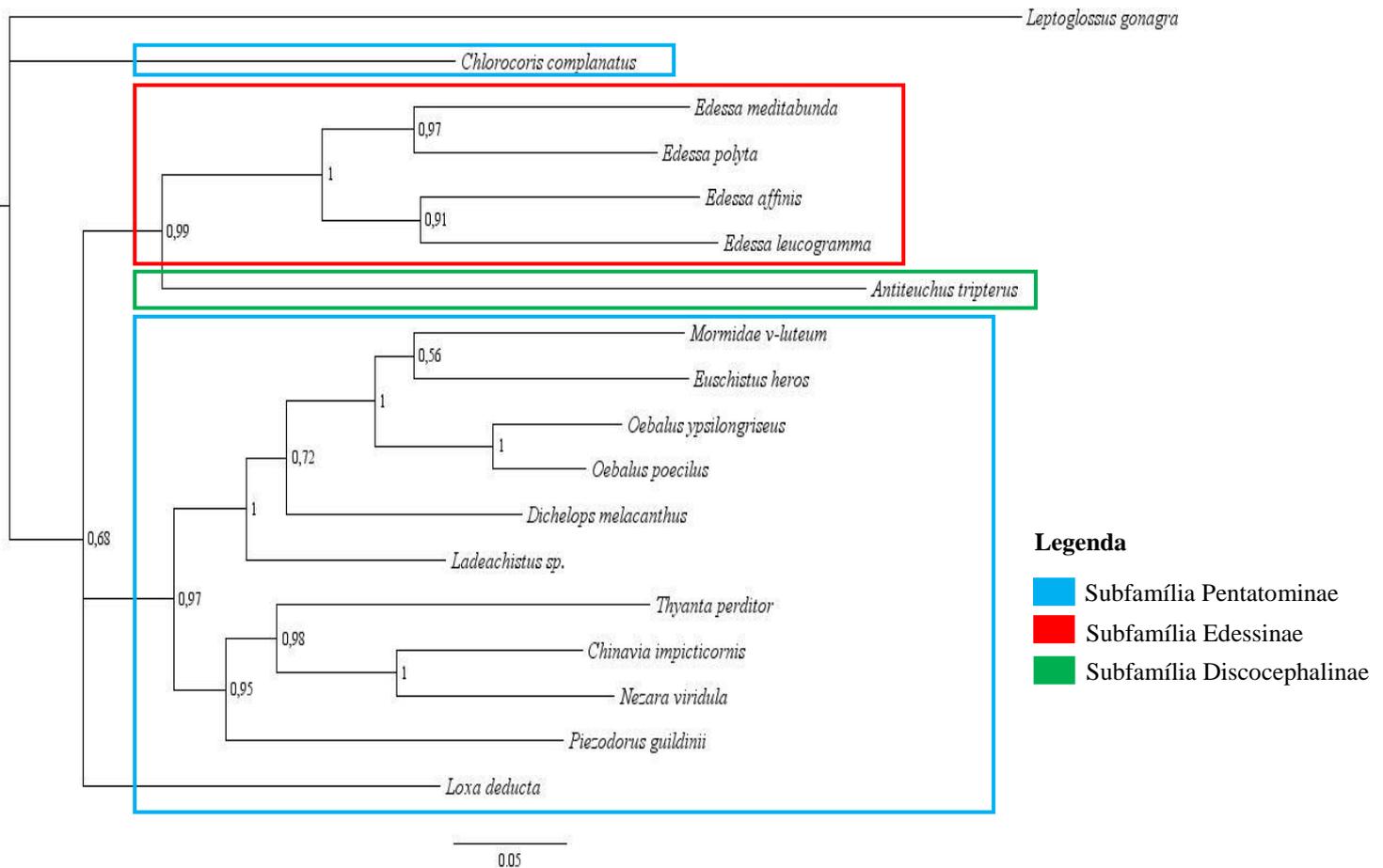


Figura 1. Árvore filogenética construída a partir do critério Inferência Bayesiana, utilizando os genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e ND5 em conjunto, implementada no programa MrBayes 3.1.

Tabela 3. Matriz de distância construída para os genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais 16S e ND5 em conjunto, para as espécies da família Pentatomidae, utilizando o critério *p-distance*. Em negrito estão representadas as maiores e menor distância genética obtida entre as espécies analisadas.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 <i>Leptoglossus gonagra</i>																			
2 <i>Edessa meditabunda</i>	0,147																		
3 <i>Edessa affinis</i>	0,134	0,088																	
4 <i>Edessa leucogramma</i>	0,142	0,083	0,075																
5 <i>Edessa polyta</i>	0,139	0,072	0,081	0,084															
6 <i>Mormidae v-luteum</i>	0,141	0,110	0,108	0,116	0,110														
7 <i>Dichelops melacanthus</i>	0,138	0,108	0,092	0,106	0,107	0,080													
8 <i>Oebalus ypsilon</i>	0,138	0,098	0,102	0,101	0,094	0,069	0,073												
9 <i>Oebalus poecilus</i>	0,137	0,105	0,105	0,107	0,093	0,075	0,068	0,044											
10 <i>Chlorocoris complanatus</i>	0,140	0,096	0,097	0,107	0,100	0,104	0,094	0,104	0,102										
11 <i>Loxa deducta</i>	0,132	0,105	0,091	0,104	0,101	0,096	0,089	0,097	0,098	0,089									
12 <i>Thyanta perditor</i>	0,127	0,109	0,100	0,110	0,106	0,085	0,083	0,089	0,094	0,098	0,100								
13 <i>Antiteuchus tripterus</i>	0,135	0,113	0,106	0,109	0,108	0,114	0,112	0,114	0,113	0,116	0,109	0,107							
14 <i>Piezodorus guildinii</i>	0,136	0,099	0,096	0,107	0,087	0,088	0,086	0,082	0,088	0,093	0,088	0,090	0,110						
15 <i>Chinavia impicticornis</i>	0,129	0,102	0,096	0,100	0,094	0,094	0,080	0,082	0,088	0,090	0,089	0,075	0,102	0,073					
16 <i>Nezara viridula</i>	0,122	0,101	0,099	0,099	0,092	0,096	0,080	0,083	0,085	0,100	0,079	0,080	0,104	0,075	0,061				
17 <i>Euschistus heros</i>	0,142	0,106	0,100	0,107	0,105	0,077	0,081	0,076	0,083	0,103	0,094	0,097	0,118	0,091	0,092	0,100			
18 <i>Ladeachistus sp.</i>	0,135	0,093	0,086	0,091	0,090	0,073	0,067	0,064	0,075	0,086	0,079	0,076	0,098	0,072	0,073	0,074	0,077		

Agradecimentos

Aos Professores Doutores Jocélia Grazia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Luiz Antônio Alves Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro-Museu Nacional) e José Antônio Marin Fernandes (Universidade Federal do Pará) pelas identificações das espécies. A CAPES, FAPESP (Processos 2010/16080-5, 2011/11054-5) e FAPERP pelos auxílios financeiros.

Referências

- BARCELLOS, A.; GRAZIA, J. Cladistic analysis and biogeography of *Brachystethus* Laporte (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). **Zootaxa** v. 256, p. 1-14, 2003.
- BARGUES, M. D., MARCILLA, A., RAMSEY, J., et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.567–573, 2000.
- 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.
- CAMPOS, L. A.; GRAZIA, J. Análise cladística e biogeografia de Ochlerini (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, n. 2, p. 147-163, 2006.

- CERETTI-JUNIOR, W., VENDRAMI, D. P., GIL, J. M. et al. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 455, 2008.
- CRYAN, J. R.; URBAN, J. M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? **Systematic Entomology**, v. 37, p. 7-21, 2012.
- FERRARI, A. Filogenia, biogeografia e revisão de *Nezara* Amyot & Serville, análise filogenética de Nezarini e áreas endêmicas de Pentatomidae na região Neotropical (Hemiptera, Heteroptera). P. 181, 2009. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2009.
- FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 34, n. 1, p. 1-21, 2008.
- FORERO, D.; BERNIKER, L.; WEIRAUCH, C. Phylogeny and character evolution in the bee-assassins (Insecta: Heteroptera: Reduviidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 66, n. 1, p. 283-302, 2013.
- FORTES, N. D.; GRAZIA, J. Revisão e análise cladística de *Serdia* Stal (Heteroptera: Pentatomidae: Pentatomini). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n.1, p. 294-339, 2005.
- FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise evolutiva**. Ed. Artmed, 2009.
- 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). **Philipp Entomol.** v. 8, p. 865-961, 1991.
- GARDIM, S., ALMEIDA, C. E., TAKIYA, D. M. et al. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian Triatoma: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 74-79, 2014.
- GOMES, M. O. Relações Filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas seqüências de genes mitocondriais (*Cyt b*, *COI* e *16S*), nucleares (*28S* e *18S*) e informações morfológicas. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013.
- 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, n. 6, p. 932-976, 2008.
- GRAZIA, J., SCHWERTNER, C. F. Checklist dos percevejos-do-mato (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomoidea) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrop.**, vol. 11, 2011.
- GRAZIA, J.; FERNANDES, J. A. M. ; SCHWERTNER, C. F. . *Stysiana*, a new genus and four new species of Pentatomini (Heteroptera: Pentatomidae). **Acta Societatis Zoologicae Bohemiae**, Praga, v. 63, p. 71-83, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 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.

HUA, J.; LI, M.; DONG, P.; CUI, Y.; XIE, Q.; BU, W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 134, 2009.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees**. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754–755, 2001.

LEE, W., KANG, J., JUNG, C. et al. Complete mitochondrial genome of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), and phylogenetic relationships of hemipteran suborders. **Molecules and cells**, v. 28, n. 3, p. 155-165, 2009.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta Trópica**. v. 110, n. 2, p. 112-136, 2009.

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.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

RIDER, D. A. (2012) Pentatomoidea Home pag-North Dakota StateUniversity. Disponível em <http://www.ndsu.edu/ndsu/rider/Pentatomoidea/Researchers/Rider_David.htm> (acessado em 15 de outubro de 2015).

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. **True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History)**. Ithaca, London: Cornell University Press, 1995.

SILVA, E. J. E. Revisão do Grupo *E. rufomarginata* do gênero *Edessa* Fabricius, 1803 (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2004.

SILVA, V. J. Análise cladística e descrição de um grupo novo de espécies de *Edessa* (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia). **Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, 2012.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.** V.87, p.651–701, 1994.

- SMITH-CALDAS, M. R. B.; MCPHERON, B.A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the fraterculus group (Anastrepha: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotrop Entomol.** V. 30, p. 565-573, 2001.
- SOUZA, H. V. Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S, 2013 p. 138 (Tese – Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TARRIO, R.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F.J.; Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. **Mol. Biol. Evol.** V. 18, p. 1464–1473, 2001.
- TIAN, Y.; ZHU, W.; LI, M. et al. Influence of data conflict and molecular phylogeny of major clades in Cimicomorphan true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 581-597, 2008.
- WALL, M. A. Phylogenetic relationships among Halyini (Pentatomidae: Pentatominae) genera based on morphology, with emphasis on the taxonomy and morphology of the Solomonius-group. Tese de Doutorado, **University of Connecticut**, 2005.
- WEILER, L. M. Análise cladística e descrição de uma nova espécie para o subgênero Lycipta Stål, 1982 (Hemiptera, Pentatomidae, Carpocorini, *Euschistus*), 2011 p. 108 (Dissertação – Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2011.
- WEIRAUCH, C., SCHUH, R.T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annu Rev Entomol.**; 56: 487-510, 2011.
- YEH, W. B., YANG, C. T., HUI, C. F. A molecular phylogeny of planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Zoological Studies**, v. 44, n. 4, p. 519, 2005.
- YUAN, M. L., ZHANG, Q. L., GUO, Z. L. et al. Comparative mitogenomic analysis of the superfamily Pentatomoidea (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) and phylogenetic implications. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 460, 2015.

IV. DISCUSSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que os marcadores moleculares analisados possuem diferentes características e grande variabilidade genética, atuando de forma significativa na reconstrução de um cenário evolutivo robusto para as espécies analisadas. Isso ocorre, devido à natureza dos genes nucleares e mitocondriais utilizados, que por possuírem taxas de evolução diferentes influenciam na resolução de inconsistências filogenéticas, principalmente de espécies com divergência recente, como ocorre com a infraordem Pentatomomorpha, a qual pertence às famílias Coreidae e Pentatomidae estudadas. As famílias dessa infraordem, provavelmente, emergiram entre os períodos Jurássico e Cretácio inferior (YAO et al, 2012).

De acordo com Philippe et al (1994) o gene 18S possui alto grau de conservação, como verificado em nossas análises, sendo apropriado para a resolução de filogenias de níveis taxonômicos superiores, como infraordens e superfamílias. Fato que também foi verificado nos resultados de Souza (2013) ao analisar espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae. Segundo Escalante e Ayala (1995), o marcador molecular nuclear 18S apresenta taxa de 0,8% de substituições por sítio por 100 m.a. Essa taxa de evolução, segundo BARGUES et al (2000), pode refletir a taxa de substituição do gene todo, contudo, diferentes taxas de evolução podem ocorrer em porções do gene 18S que possuem evolução mais rápida. O gene nuclear ribossomal 28S, embora também seja altamente conservado, pode evoluir mais rápido que o gene 18S, principalmente, por possuir diferentes segmentos de expansão, como as regiões D1, D2 e D3 (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Esse dado está de acordo com a proporção de sítios variados observados em ambas as sequências analisadas, visto que, embora os genes sejam conservados, o 28S apresentou-se com maior variação que o 18S.

Nas análises também foram avaliadas a composição nucleotídica das sequências. Em ambos os marcadores nucleares foi observado maior porcentagem de bases CG, concordante com as análises de Souza (2013) para o gene 18S em Pentatomidae e Coreidae. O mesmo foi verificado por BARGUES et al (2000) ao sequenciar o gene 18S de Triatomíneos e por Li et al (2012) ao analisar as infraordens de Heteroptera. Isso ocorre porque genes ribossomais nucleares têm, geralmente, composição de base menos tendenciosa a A+T, como ocorre com genes de origem mitocondrial, embora exceções sejam conhecidas (TARRIO et al, 2001).

Os genes 18S e 28S utilizados apresentaram baixa razão de mutações de transição e transversão (Ts/Tv), estando de acordo com os resultados de Li et al (2012) e Tian et al (2008). Essas razões podem ser explicadas pelo fato de que as sequências de DNA nuclear ribossômico,

geralmente, evoluem mais lentamente do que genes mitocondriais (MAS-COMA; BARGUES, 2009), acumulando, dessa forma, um menor número de mutações ao longo do tempo. Outro fator é que estas sequências exibem maior número de mutações de transição, em relação às transversões, o que pode ser explicado devido ao eficiente mecanismo de reparo do DNA nuclear, o qual detecta mais facilmente transversões do que transições, visto que causam maiores disrupções na dupla hélice do DNA (FREEMAN; HERRON, 2009).

Por outro lado, os dados obtidos a partir dos marcadores moleculares mitocondriais apresentaram-se opostos aos nucleares em todos os parâmetros estudados, visto que os fragmentos gênicos 16S e ND5 se mostraram altamente variáveis e com alta porcentagem de sítios parcimoniosos, assim como observado por Li et al (2012a).

É sabido que o genoma mitocondrial de percevejos tem padrão semelhante ao encontrado para a maioria dos genomas mitocondriais de Hexapoda, correspondendo a uma inclinação positiva para bases AT e negativas para GC. Isto foi verificado em nosso estudo, pois para os genes ND5 e 16S, bem como esses marcadores mitocondriais concatenados, a presença de bases AT ultrapassou 70%. Esses dados são corroborados por Yeh et al (2005) ao estudar as relações de Fulgoroidea (Hemiptera), pois encontraram 73,7% de bases AT em seu genoma mitocondrial. Valores maiores que 70% também foram observados para o gene 16S para essas bases em análises das infraordens de Heteroptera (LI et al, 2012b), bem como para a infraordem Cimicomorpha (TIAN et al, 2008).

Genomas mitocondriais de metazoários, normalmente, apresentam viés na composição de bases, tendo inclinação positiva para Adeninas e Timinas. Isso ocorre porque uma cadeia pode ser composta por $A (\%) > T (\%)$ e $C (\%) > G (\%)$, enquanto que a outra cadeia, devido à complementariedade de base, é caracterizada por possuir $T (\%) > A (\%)$ e $G (\%) > C (\%)$. Esse viés pode ser consequência de padrões assimétricos de modificações na cadeia, onde algumas mutações são mais comuns do que os seus complementos, gerando assim desigualdades entre as frequências das bases complementares A/T e C/G (HASSANIN, 2006).

Neste estudo foi verificado que os genes mitocondriais apresentaram elevadas razões de mutação transição/transversão, indicando que possuem maiores taxas de substituição nucleotídica e que em sua maioria as substituições são transições. Esse dado se mostrou diferente do encontrado por Tian et al (2008) ao analisar o gene 16S para a infraordem Cimicomorpha, visto que observou maior quantidade de transversões nas sequências mitocondriais estudadas. Embora nossos dados não tenham sido semelhantes aos encontrados por outros autores, em relação à proporção de transições e transversões, constatamos que os genes mitocondriais demonstraram maior quantidade de polimorfismos quando comparados aos genes nucleares

analisados. Isso pode ocorrer porque o genoma mitocondrial não possui algumas enzimas de reparo do DNA, culminando, dessa forma em uma maior taxa de erros de reparo e, conseqüentemente, maior taxa de substituição de bases (FREEMAN; HERRON, 2009), como foi verificado para os genes 16S e ND5 analisados.

Sendo assim, genes mitocondriais evoluem a taxas mais elevadas quando comparados a genes que codificam proteínas nucleares. Em insetos a taxa de evolução do genoma mitocondrial pode ser de duas a nove vezes maior que em genes nucleares, tornando essas sequências vantajosas para o estudo de táxons estreitamente relacionados que divergiram recentemente (MAS-COMA; BARGUES et al, 2009). Essa diferença em relação à taxa de substituição nucleotídica de marcadores mitocondriais e nucleares pode ser verificada quando comparamos os genes 16S e 18S, visto que o primeiro tem uma estimativa de substituição de bases de $1,8 \times 10^{-10}$ substituições por sítio por 100 m. a. (OCHMAN; WILSON, 1987), ao passo que o segundo o possui uma taxa de 0,8% de substituição por sítio por 100 m.a. (em organismos multicelulares para os quais o tempo de divergência é conhecido) (ESCALANTE; AYALA, 1995).

A reconstrução filogenética realizada para as espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, utilizando os marcadores nucleares 18S e 28S a partir do método de Inferência Bayesiana evidenciou que Pentatomidae se comportou como um grupo monofilético, assim como foi constatado por Grazia et al (2008).

Contudo, resultados discordantes foram obtidos ao se observar as relações filogenéticas apresentadas para as subfamílias de Pentatomidae, utilizando apenas os marcadores nucleares quando comparados aos genes 18S e 28S aliados aos genes mitocondriais 16S e ND5. Na análise das subfamílias de Pentatomidae com os genes mitocondriais concatenados com os nucleares, apenas Asopinae não estava representada. Essa subfamília, na topologia obtida a partir dos genes 18S e 28S em conjunto se apresentou parafilética, resultado contrário ao obtido por Gapon e Konstantinov (2006) que a considera um grupo monofilético, com base em caracteres morfológicos. As demais subfamílias e tribos foram analisadas com os marcadores mitocondriais e nucleares e obtiveram histórias evolutivas distintas, exceto Pentatominae, que se mostrou polifilética para nas análises com todos os marcadores moleculares, corroborando os resultados de Campos e Grazia (2006). Edessinae formou um agrupamento monofilético para as análises contendo genes mitocondriais enquanto que para a topologia apenas com genes nucleares não formou um clado. A ausência de um grupo monofilético composto por Edessinae foi concordante aos dados de Silva (2012) ao analisar essa subfamília por dados morfológicos, no entanto, foi contrário aos resultados encontrados por Barcellos e Grazia (2003) e Silva (2004) que suportaram a monofilia de Edessinae e do gênero *Edessa*, respectivamente, com base em dados

morfológicos, e, portanto semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho para a reconstrução filogenética de Edessinae que utilizou os genes 18S, 28S, 16S e ND5 em conjunto.

Em relação as tribos de Pentatominae, nenhuma apresentou-se monofilética para as filogenias com os genes nucleares. Todavia quando os genes mitocondriais foram adicionados as análises as tribos Nezarini e Carporocorini constituíram grupos monofiléticos. Portanto, a definição das tribos de Pentatominae ainda permanece como objeto de debates, visto que poucas foram estudadas recentemente e muitas ainda necessitam de revisões (WALL, 2005) para o melhor conhecimento de suas relações de parentesco.

A família Coreidae, que foi analisada apenas por meio dos genes nucleares 18S e 28S, não constituiu um grupo monofilético. Esse resultado foi semelhante ao de Gomes (2013) ao analisar membros desse táxon a partir dos genes Cyt b e 28S, embora discorde dos resultados de Li (1996) que consideram essa família, assim como a subfamília Coreinae e suas tribos, exceto Chariesterini, grupos monofiléticos bem suportados.

As análises obtidas mostraram que as tribos de Coreidae ainda carecem de estudos mais abrangentes, visto que a maioria delas não apresentou padrões de agrupamento ou não puderam ter suas posições filogenéticas confirmadas devido ao baixo número de exemplares analisados e baixo suporte nos ramos como para as tribos Menenotini, Acanthocerini, Acantocephalini e Chariesterini ao passo que Anisoscelidini e Coreinae constituíram grupos polifiléticos e Mictini se comportou como parafilética corroborando os resultados de Gomes (2013) que ao utilizar os genes 18S, 28S, 16S, COI, Cytb e 16S, concatenados, verificou que as tribos Anisoscelidini e Coreini comportaram-se como polifiléticas. Em seu estudo a autora atribui a não formação de clados entre as espécies pertencentes às tribos de Coreinae ao baixo número de representantes estudados.

Estes dados demonstram, portanto, a importância de novas análises utilizando um maior número de caracteres moleculares, morfológicos, citogenéticos, comportamentais, assim como um maior número de espécies para nos aproximarmos melhor das corretas relações evolutivas das tribos, subfamílias e famílias de Pentatomomorpha.

V. CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou que os genes nucleares 18S e 28S não são bons marcadores para resoluções filogenéticas em nível de famílias, subfamílias e tribos de Coreidae e Pentatomidae, visto que os suportes dos ramos não permitiram que houvesse confiabilidade na análise realizada.

Contudo, ao considerarmos as relações filogenéticas geradas a partir de genes nucleares aliados aos mitocondriais, para a família Pentatomidae, verificou-se alto suporte nos ramos, e portanto, maior confiabilidade na análise, assim como a formação de grupos monofiléticos para a maioria das tribos estudadas. É importante ressaltar, no entanto, que o *status* taxonômico das espécies *Loxa deducta* e *Chrolocoris complanatus* precisa ser revisto e confirmado como membros de Pentatomini, visto que não se agruparam com a subfamília Pentatominae.

Em relação à família Coreidae, além da necessidade de se realizar novas análises, com um maior número de espécies e com um maior número de caracteres, para esclarecer a composição e classificação de suas tribos, é de grande importância revisar o *status* taxonômico das espécies *Dallacoris pictus* e *D. obscura*, pertencentes a tribo Leptoscelini, visto que ambos se agruparam, com alto suporte, com as espécies *Leptoglossus gonagra* e *L. zonatus*, pertencentes a tribo Anisoscelidini.

Para tanto são necessários mais estudos, abordando diferentes marcadores moleculares, em especial, genes mitocondriais, que mostraram-se mais adequados para resoluções filogenéticas a níveis taxonômicos mais inclusivos, como famílias, subfamílias e tribos. Essas análises precisam ser estendidas às demais espécies de Pentatomidae, incluindo a subfamília Asopinae assim como para as espécies da subfamília Coreinae de Coreidae. A utilização de outros marcadores moleculares como COI, *Cyt b* e genes da família NADH desidrogenase, que apresentam maior taxa de evolução, aliados a caracteres morfológicos, comportamentais e citogenéticos podem auxiliar no esclarecimento, revisão e suporte da classificação atual das relações entre as espécies de grande importância econômica das famílias Pentatomidae e Coreidae que permanecem pendentes.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDEA, A. F. F. Revisão de *Oenopiella* Bergroth, 1891 (Hemiptera, Pentatomidae, Carpocorini). 2013, p. 56 (Dissertação – Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2013.
- ARIAS, M. C., INFANTE-MALCHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA – In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. Holos, Ribeirão Preto 2001.
- BARCELLOS, A.; GRAZIA, J. Cladistic analysis and biogeography of *Brachystethus* Laporte (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). **Zootaxa** v. 256, p. 1-14, 2003.
- BARGUES, M. D., MARCILLA, A., RAMSEY, J., et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.567–573, 2000.
- BOHER, B.; DANIEL, J. F.; FABRES G.; BANI, G. Action de *Pseudotheraptus devastans* (Distant)(Het. Coreidae) et de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. dans le développement de chancres et la chute des feuilles chez le manioc (*Manihot esculenta* Crantz)(1). **Agronomie**, v. 3, n. 10, p. 989-994, 1983.
- BROWN, K. S. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *Journal of Insect Conservation*, v. 1, n. 1, p. 25-42, 1997.
- CAMPOS, L. A.; GRAZIA, J. Análise cladística e biogeografia de Ochlerini (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, n. 2, p. 147-163, 2006.
- CASSIS, G.; GROSS, G. F. Hemiptera: Heteroptera (Pentatomomorpha). **Zoological Catalogue of Australia**. Vol. 27.3 B, 2002.
- CORNELI, O. S.; WARD, R. H. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the reliability of branch length estimation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 224-234, 2000.
- COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil – Hemípteros, 2º Tomo, Capítulo XXII**. Escola nacional de agronomia, série didática n. 3, 1940.
- CRYAN, J. R.; URBAN, J. M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? **Systematic Entomology**, v. 37, p. 7-21, 2012.
- ESCALANTE, A. A.; AYALA, F.J. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 5793-5797, 1995.
- FERNANDES, J. A. M.; VAN DOESBURG, P. H. The E. dolichocera-group of *Edessa* Fabricius, 1803 (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **Zoologische Mededelingen**, v. 73, p. 305-315, 2000.
- FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 34, n. 1, p. 1-21, 2008.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise evolutiva**. Ed. Artmed, 2009.

GAPON, D. A.; KONSTANTINOV F. V. On the Structure of the Aedeagus of Shield Bugs (Heteroptera, Pentatomidae): III. Subfamily Asopinae. **Entomological Review**, vol. 86, n. 7, p. 806–81, 2006.

GOMES, M. O. 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. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013

GOVEIA, C. O. Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). **Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou**, Belo Horizonte, 2010.

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, n. 6, p. 932-976, 2008.

GRAZIA, J., SCHWERTNER, C. F. Checklist dos percevejos-do-mato (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomoidea) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrop.**, vol. 11, 2011.

HASSANIN, A. Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: Strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. **Molecular Phylogenetics and Evolution** . v.38, p. 100–116, 2006

HEBSGAARD, M.; ANDERSEN, N.; DAMGAARD, J. Phylogeny of the true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera-Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. **Systematic Entomology**. v. 29, n. 4, p. 488-508, 2004.

HENRY, T. J. Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 3, p. 275-301, 1997.

HENRY, T.J. Biodiversity of Heteroptera. **Insect biodiversity: science and society**, p. 223-263, 2009.

HUA, J.; LI, M.; DONG, P.; CUI, Y.; XIE, Q.; BU, W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 134, 2009.

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.

JORGENSEN, R.A., CLUSTER, P.D. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v.75, p. 1238–1247, 1988.

LESTON, D., PENDERGRAST, J.G., SOUTHWOOD, T.R.E. Classification of the terrestrial Heteroptera (Geocorisae). **Nature** (Lond.) v. 174, 1954.

LI, H., LIU, H., CAO, L. et al. The complete mitochondrial genome of the damsel bug *Alloeorhynchus bakeri* (Hemiptera: Nabidae). **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 1, p. 93, 2012a.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. **PLoS ONE**, v. 7, 2012b.

LI, H. M.; DENG, R. Q.; WANG, J. W. et al. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 2, p. 313-326, 2005

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

MAHNER, M. Systema Cryptoceratorum Phylogenicum (Insecta, Heteroptera). **Zoologica** v. 48, p.1–302, 1993.

MANNA, G. K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (Eds.) Chromosomes in evolution of Eukaryotic groups. **CRC Press Llc**, p. 189-225, 1984.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M.D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta Trópica**. v. 110, n. 2, p. 112-136, 2009.

MITCHELL, P. L. Leaf-footed bugs (Coreidae). In SCHAEFER C.W.; PANIZZI, A. R. (Eds) **Heteroptera of economic importance**. CRC Press, Boca Raton, P. 337-403, 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.

OCHMAN, H., WILSON, A. C. Evolution of bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **J Mol Evol**. V. 26, p. 74-86, 1987.

PALL, J. L.; COSCARÓN, M. C. Synopsis of Acanthocerini (Hemiptera, Coreidae) from Argentina. **ZooKeys**, n. 305, p. 33–53, 2013.

PANIZZI, R.A.; McPHERSON, J.E.; JAMES, D.G. et al. Stink bugs (Pentatomidae). In: SCHAEFER C.W.; PANIZZI, A. R. (Eds) **Heteroptera of economic importance**. CRC Press, Boca Raton, p.421-474, 2000.

PHILIPPE, H.; CHENUIL, A.; ADOUTTE, A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? **Development**, p. 15–25, 1994.

QUINTERO L.; NAVARRO J. C. Filogenia intraespecífica y variabilidad genética de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) con los genes mitocondriales ND5 y COI. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 52, n. 1, p. 46-65, 2012

RIDER, D. A. (2012) Pentatomoidea Home pag-North Dakota StateUniversity. Disponível em <http://www.ndsu.edu/ndsu/rider/Pentatomoidea/Researchers/Rider_David.htm> (acessado em 15 de outubro de 2015).

RIDER, D.A (2006). **Pentatomoidea Home Page**. North Dakota State University. Disponível em <http://www.ndsu.nodak.edu/ndsu/rider/Pentatomoidea/>, acessado em 15 de outubro de 2015.

RIVERA, L. M. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P. R. M. Variabilidade genética de espécies de Culicidae e Simuliidae usando marcador mitocondrial. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 23-31, 2012.

ROLSTON, L.H. Key and diagnoses for the genera of Ochlerini (Hemiptera: Pentatomidae: Discocephalinae). **J. N. Y. Ent. Soc**, v. 100, n. 1, p.1-41, 1992.

SCHAEFER, C. W. The Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera): an annotated outline of its systematic history. **European Journal of Entomology**, v. 90, p. 105-105, 1993.

SCHAEFER, W.C.; PANIZZI, A.R. **Heteroptera of Economic importance**. CRC Press Boca Raton, p. 824. 2000.

SCHERBAKOV D. E., POPOV Y. A. Superorder cimicidea laicharting, 1781. Order Hemiptera linne, 1758. The bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. Rasnitsyn, A. P. Quicke, D. L. J. **History of insects**, p. 143-157, 2002

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. **True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History)**. Cornell University Press, 1995.

SCHWARTZ, S.; ZHANG, Z.; FRAZER, K. A. et al. PipMaker – A web server for Aligning two genomic DNA sequences. **Genome Research**, v. 10, n. 4, p. 577-586, 2000.

SILVA, E. J. E. Revisão do Grupo *E. rufomarginata* do gênero *Edessa* Fabricius, 1803 (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biociências, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2004.

SILVA, V. J. Análise cladística e descrição de um grupo novo de espécies de *Edessa* (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia). **Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, 2012.

SOUZA, H. V. Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S, 2013, 138 f. Tese (Doutorado em Genética). Programa de Pós-Graduação em Genética, **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, São José do Rio Preto, 2013.

TARRIO, R.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F.J.; Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. **Mol. Biol. Evol.** V. 18, p. 1464–1473, 2001.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A. et al. DNA points the way ahead in taxonomy. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 479-479, 2002.

- TIAN, Y.; ZHU, W.; LI, M. et al. Influence of data conflict and molecular phylogeny of major clades in Cimicomorphan true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 581-597, 2008.
- UESHIMA, N. **Animal cytogenetics, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera**. Gebrüder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 1979.
- WALL, M. A. Phylogenetic relationships among Halyini (Pentatomidae: Pentatominae) genera based on morphology, with emphasis on the taxonomy and morphology of the *Solomonius*-group. Tese de Doutorado, **University of Connecticut**, 2005.
- WEILER, L. M. Análise cladística e descrição de uma nova espécie para o subgênero *Lycipta* Stål, 1982 (Hemiptera, Pentatomidae, Carpocorini, *Euschistus*), 2011 p. 108 Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2011.
- WEIRAUCH, C. AND MUNRO, J. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 287-299, 2009.
- WEIRAUCH, C., SCHUH, R.T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annu Rev Entomol.**; 56: 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. **Insect Systematics & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 121-137, 1993.
- WOESE, C.; FOX, G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.
- XIE Q, BUW, ZHENG L. The Bayesian phylogenetic analysis of the 18S rRNA sequences from the main lineages of Trichophora (Insecta: Heteroptera: Pentatomomorpha). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 34, n. 2, p. 448-451, 2005.
- XIE, Q., TIAN, Y., ZHENG, L., BU, W. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 463-471, 2008.
- YAGI, T.; SASAKI, G.; TAKEBE, H. Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 1, p. 42-48, 1999.
- YAO, Y., REN, D., RIDER, D. A., CAI, W. Phylogeny of the infraorder Pentatomomorpha based on fossil and extant morphology, with description of a new fossil family from China. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.
- YEH, W. B., YANG, C. T., HUI, C. F. A molecular phylogeny of planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Zoological Studies**, v. 44, n. 4, p. 519, 2005.