



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

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha  
(Heteroptera)

São José do Rio Preto  
2019

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha  
(Heteroptera)

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

Financiadora: CNPq – Proc. 140726/2015-2

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mary Massumi  
Itoyama  
Coorientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti  
Cabral de Mello

São José do Rio Preto  
2019

F525i Firmino, Tatiani Seni de Souza  
Inferências evolutivas e citotaxonômicas em Pentatomomorpha  
(Heteroptera) / Tatiani Seni de Souza Firmino. -- São José do Rio  
Preto, 2019  
75 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto  
de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto  
Orientadora: Mary Massumi Itoyama  
Coorientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

1. Citogenética molecular. 2. Técnica de FISH. 3. Percevejos. 4.  
DNAr 45S. 5. Marcador 18S. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de  
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha  
(Heteroptera)

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

Financiadora: CNPq – Proc. 140726/2015-2

Comissão Examinadora

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi  
UNESP – Câmpus de Botucatu

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa  
UNESP – Câmpus de Araraquara

Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida  
UNICAMP – Câmpus de Campinas

Prof. Dr. Luis Lenin Vicente Pereira  
UNILAGO - Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
08 de março de 2019

# *Dedicatória*

---

Ao meu Amado filho Pedro,  
que chegou como um presente  
do céu no comecinho da minha  
graduação, para ser a minha  
fortaleza e inspiração durante  
todos estes anos, me  
auxiliando em cada passo,  
cada decisão e por me dar  
forças para tornar este sonho  
real.

# *Agradecimientos*

---

Ao término de mais uma etapa de minha vida, eu não poderia deixar de agradecer à colaboração direta ou indireta das pessoas que convivem comigo, as quais contribuíram e muito para a concretização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades, sem Ele nada disso seria possível.

A todos os meus ex-professores (pré-escola, ensino fundamental, ensino médio, ensino superior e pós-graduação) que atuam na mais bela das profissões e são os grandes responsáveis pela formação que proporcionou chegar até aqui.

À minha orientadora Mary, que me acolheu em seu laboratório, me conduzindo no caminho da pesquisa e por ter sido muito mais que uma orientadora durante anos.

Ao meu coorientador Diogo por todos os ensinamentos, tão essenciais nesta etapa, e por propiciar toda a parte prática dos meus experimentos.

Ao Kaio por toda solicitude, por me amparar quando eu mais precisei, minha eterna gratidão.

Ao meu precioso filho Pedro, por ser minha luz, minha inspiração, pelos abraços aconchegantes e carinhos que revitalizam.

À minha querida mãe, que mesmo longe se faz sempre muito presente, me apoiando e auxiliando em todas as minhas decisões.



À minha querida irmã Tânia, por todos os incentivos, pelo carinho, por ser tão amiga e prestativa.

Ao meu marido Fabricio, por todo amor e paciência. Por sempre me incentivar a lutar pelos meus sonhos, me ajudando a torna-los reais.

À minha tia Mara e prima Pâmela pelo amor diário que recebo.

Aos meus amados filhos do coração Grazi, Maitê, Marcos, Dani e Leandra por encherem os nossos dias de esperança.

Aos meus filhos de quatro patas, Toti e Max, pela alegria que demonstram toda vez que chego em casa, por ficarem sempre grudadinhos em mim e por preencherem a minha vida com fofurices.

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

Aos meus amigos de laboratório por serem a minha segunda família.

A todos os amigos que fiz durante a infância, o ensino fundamental, o ensino médio, a graduação e a pós-graduação. Felizmente são muitos nomes, mas cada um sabe do amor que tenho por vocês.

À Direção do IBILCE/UNESP, ao departamento de Biologia e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociências deste Instituto. Por propiciarem as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo nº 140726/2015-2) pela bolsa de doutorado.

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!

**“Pedras** no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um **castelo!**”  
Fernando Pessoa

# *Resumo*

---

## Resumo

Com o objetivo de auxiliar na compreensão da evolução cromossômica de Heteroptera e na busca por compreender como o genoma se organiza/reorganiza para a posição cromossômica do DNAr 45S, foram analisadas 15 espécies de Heteroptera com a sonda de DNAr 18S e comparamos nossos resultados com aqueles descritos na literatura para as infraordens Pentatomomorpha, Cimicomorpha e Nepomorpha. O mapeamento do gene 45S na família Coreidae demonstrou que as espécies apresentaram marcações nos autossomos, com exceção de *Acantocephala parensis* e *Leptoglossus gonagra*, que apresentaram marcações em m-cromossomos. A maioria das espécies da família Pentatomidae apresentou marcação nos autossomos, com exceção de duas espécies que apresentaram o DNAr 45S no cromossomo X e duas que apresentaram marcação nos cromossomos sexuais X e Y. Espécies da família Pyrrhocoridae apresentaram marcações DNAr 45S em autossomos, cromossomo X e Neo X. As famílias Largidae e Scutelleridae foram representadas por apenas uma espécie que apresentou marcação no cromossomo X e em um par de autossomos, respectivamente. O estudo dos genes ribossômicos na infraordem Nepomorpha é restrito ao conhecimento dos marcadores em seis espécies da família Belostomatidae (marcação nos autossomos ou cromossomos sexuais). E a infraordem Cimicomorpha mostrou grande variabilidade para o gene 45S, incluindo intraespecífica. Miridae e Cimicidae apresentaram marcações restritas aos cromossomos sexuais, já Tingidae e Reduviidae apresentaram marcadores nos autossomos e/ou cromossomos sexuais. Com base nisso, caracterizamos o arranjo de 45S DNAr nos cromossomos de Heteroptera e discutimos os principais eventos evolutivos relacionados à reorganização genômica dessas espécies durante os eventos de evolução do cromossomo e cariótipo nas infraordens Pentatomomorpha, Cimicomorpha e Nepomorpha.

**Palavras-chave:** Pentatomomorpha; Cimicomorpha; Nepomorpha; FISH; DNAr 45S

# *Abstract*

---

## ABSTRACT

With the objective of assisting in the understanding of the chromosome evolution of Heteroptera and in the quest to understand how the genome organizes/reorganizes for the chromosomal position of the 45S rDNA, we analyzed 15 species of Heteroptera grouped in the Pentatomomorpha infraorder with the probe of 18S rDNA and we compare our results with those described in the literature for Pentatomomorpha, Cimicomorpha and Nepomorpha infraorders. The mapping of the 45S gene in the Coreidae family demonstrated that the species presented markings on the autosomes, with the exception of *Acantocephala parensis* and *Leptoglossus gonagra* that showed markers on m-chromosomes. Most species of the Pentatomidae family showed marking in the autosomes, except for two species that had 45S rDNA on X sex chromosome and two that showed marking on the X and Y sex chromosomes. Species of the Pyrrhocoridae family showed 45S rDNA markers in autosomes, X chromosome as well as in Neo X. The Largidae and Scutelleridae families were represented by only one species that showed marking on the X sex chromosome and on a pair of autosomes, respectively. The study of ribosomal genes in the Nepomorpha infraorder is restricted to the knowledge of the markers in six species of the Belostomatidae family (marking on the autosomes or sex chromosomes) and in the Cimicomorpha infraorder showed great variability for the 45S gene, including intraspecific: Miridae and Cimicidae presented markings restricted to sex chromosomes and Tingidae and Reduviidae showed markers on the autosomes and/or sex chromosomes. Based on this, we characterized the arrangement of 45S DNAr in the chromosomes of Heteroptera and discussed the main evolutionary events related to the genomic reorganization of these species during the events of chromosome and karyotype evolution in Pentatomomorpha, Cimicomorpha and Nepomorpha infraorders.

**Keywords:** Pentatomomorpha; Cimicomorpha; Nepomorpha; FISH; 45S rDNA

# *Sumário*

---



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	Heteroptera: características gerais.....	18
1.2	Heteroptera: características citogenéticas.....	20
1.3	Infraordem Pentatomomorpha.....	22
1.4	Infraordem Cimicomorpha.....	23
1.5	Infraordem Nepomorpha.....	24
1.6	O DNA ribossômico 45S.....	25
1.7	A Sonda 18S e a Técnica de FISH.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	Material biológico e obtenção de cromossomos.....	31
3.2	Isolamento do DNA.....	32
3.3	Hibridização in situ Fluorescência.....	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
4.1	Capítulo 1: <b>Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Heteroptera based on the chromosomal location of ribosomal genes</b> .....	37
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	66
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

# *Introdução*

---

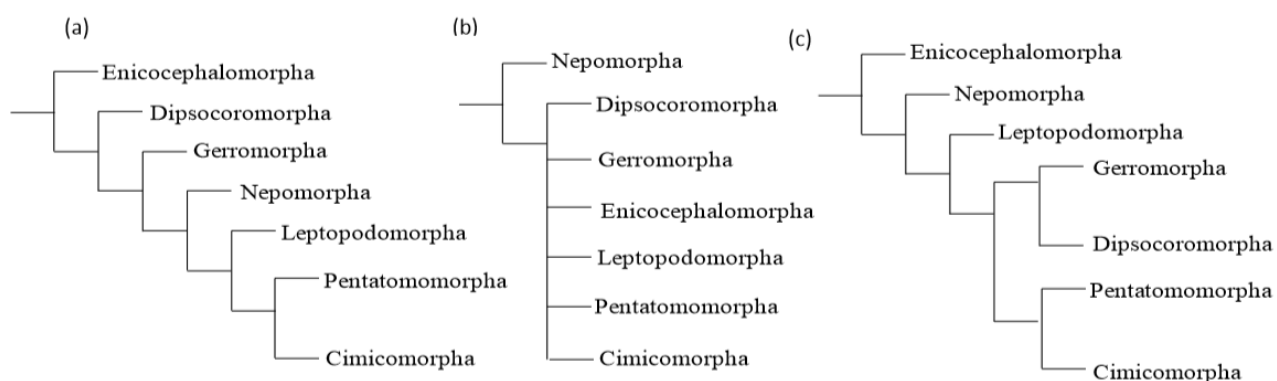
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Heteroptera: características gerais

A Subordem Heteroptera pertence ao Filo Arthropoda, a Classe Insecta e a Ordem Hemíptera. É constituída por sete infraordens (Leptopodomorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Pentatomomorpha, Cimicomorpha, Dipsocoromorpha e Enicocephalomorpha), com aproximadamente 80 famílias e mais de 40.000 espécies descritas. Possui habitat bem diversificado, a maioria das famílias ocorre em todos continentes (exceto na Antártica) e em muitas ilhas. Havendo espécies aquáticas, terrestres e micro predadores de pássaros e morcegos (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. As hipóteses propostas por Wheeler et al. (1993) (Figura 1a) e Xie et al. (2008) (Figura 1c), 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), assumem que Nepomorpha é um táxon irmão do restante dos Heteroptera (Figura 1b) (revisão em WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

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



Algumas das infraordens se destacam por agrupar espécies consideradas nocivas como, por exemplo, alguns representantes de Cimicomorpha e Pentatomomorpha. Elas incluem espécies hematófagas, vetores da doença de Chagas aos humanos e da raiva aos morcegos (Cimicomorpha), e espécies fitófagas, pragas de culturas agrícolas (grãos e frutos), como por exemplo, a espécie *Pachycoris torridus* (Pentatomomorpha) (SCHAEFER; PANIZZI, 2000; SOUZA-FIRMINO et al., 2016). Contudo, sua importância econômica também envolve espécies benéficas ao homem, como membros da família Belostomatidae (Nepomorpha) que possui hábito alimentar predador, tornando-se importantes agentes no controle biológico (CHIRINO et al., 2013).

Os Heteroptera são hemimetábulos (metamorfose incompleta, sem a fase larval), durante o desenvolvimento, passam pelas fases de ovo, ninfa (com 5 instares), e adulto. As ninfas apresentam coloração variada, completando o desenvolvimento em aproximadamente 25 dias, se parecem com os adultos, exceto pela ausência do desenvolvimento das asas e da genitália (GULLAN; CRANSTON, 2008). Os adultos iniciam a cópula em 10 dias e as primeiras oviposições ocorrem em média após 13 dias. Apresentam longevidade que varia de 50 a 120 dias e número de gerações anuais de 3 a 6 dependendo da região. Ocorre dimorfismo sexual, no qual as fêmeas, em geral, são maiores que os machos. A distinção sexual é feita principalmente pelo formato da genitália, nos machos com uma placa única (pigóforo) e nas fêmeas com duas placas laterais (GALLO et al., 2002).

São chamados de Maria-fedida por produzirem um odor desagradável emitido pelos ductos das glândulas produtoras de cheiro, que se abrem na região do metapleura. (PANIZZI et al., 2000). Os percevejos são insetos sugadores, ou seja, introduzem os estiletes no substrato para se alimentar. As espécies fitófagas, ao fazerem isto, causam injúrias aos tecidos vegetais, resultando em murcha e, em muitos casos, o aborto de frutos e sementes. Eles podem sugar várias estruturas das plantas, porém as sementes e os frutos são os locais preferenciais para sua alimentação. Durante o processo de

alimentação eles também podem transmitir patógenos a plantas, o que aumenta seu potencial de dano, podendo causar assim grandes danos às produções agrícolas, como por exemplo, de grãos (feijão, milho ou soja), frutos (laranja, caju, bucha ou tomate), podendo afetar a cadeia alimentar (SCHUH; SLATER, 1995). Devido ao fato de se alimentarem de várias espécies vegetais de importância econômica, eles são considerados importantes pragas agrícolas (PANIZZI et al., 2000). Mas seus estudos ainda são pouco explorados.

## **1.2. Heteroptera: Características Citogenéticas**

Com relação aos dados citogenéticos, poucas são as famílias que já foram descritas (SOUZA; ITOYAMA, 2006). Os Heteroptera possuem algumas características peculiares: os cromossomos são holocêntricos (sem centrômero localizado), nenhuma estrutura cinetocórica está presente nas células meióticas (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996), a atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, nas regiões teloméricas (MOTZKO; RUTHMANN; 1984; SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZALEZ-GARCIA et al., 1996), a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os sexuais (SOUZA; ITOYAMA, 2006).

Os sistemas cromossômicos do sexo já descritos são: simples XY/XX (74,7% das espécies), X0/XX (14,8%) e múltiplos (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente, do cromossomo Y,  $X_n0/X_nX_n$ ,  $X_nY/X_nX_n$  e  $XY_n/XX$ ) (10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984). Há, ainda, um sistema particular neo-XY (0,2%) (CHICKERING; BACORN, 1933; SCHRADER, 1940; JANDE, 1959).

Na literatura, discute-se a origem dos complementos cromossômicos constituídos de maior número de cromossomos a partir do menor número, por duplicação ou fissão de um dos pares de autossomos (UESHIMA; ASHLOCK, 1980). Segundo Jacobs (2004), pelo fato dos Heteroptera apresentarem

cromossomos holocêntricos, os fragmentos que se originam devido a quebras cromossômicas, geralmente movem-se regularmente para os polos durante a anáfase e sobrevivem por muitas gerações celulares. A fissão pode, portanto, levar ao aumento do número cromossômico. Da mesma maneira, a fusão cromossômica é, também, teoricamente fácil de ocorrer em organismos homocêntricos. Devido a esses processos o número de cromossomos em Heteroptera podem variar de quatro (*Belostomatidae*) a 80 (*Miridae*) (UESHIMA, 1979). Em geral, os cariótipos dos Heteroptera apresentam diminuição gradual do tamanho cromossômico (PAPESCHI; BRESSA, 2006).

Em relação ao sistema cromossômico do sexo, as superfamílias mais primitivas Nepoidea e Gelastocoroidea apresentam sistema simples e múltiplo, com a presença do cromossomo Y (XY e  $X_nY$ ). Já as superfamílias mais recentes Naucoroidea e Notonectoidea apresentam um par de m-cromossomos e diferentes sistemas cromossômicos do sexo ( $X_0/XX$  e  $X_1X_2_0/X_1X_1X_2X_2$ ), sem o cromossomo Y. Os dados citogenéticos disponíveis sugerem que a ausência de m-cromossomos e a presença de cromossomos sexuais X e Y poderiam ser considerados caracteres plesiomórficos. Os sistemas cromossômicos do sexo  $X_0$  e  $X_1X_2_0$  devem ter originado durante a evolução, por meio da perda do cromossomo Y e posterior fragmentação do cromossomo X; esses sistemas juntamente com a presença de um par de m-cromossomos poderiam ser considerados como caracteres derivados. Os m-cromossomos são um par cromossomos minúsculo, presentes em algumas famílias de Heteroptera. Eles possuem um comportamento meiótico especial, sendo geralmente observados não pareados durante a prófase meiótica e nenhum quiasma é detectado entre eles. É incerto qual é a origem desse par de cromossomos e qual é a sua função no sistema genético das espécies que os possuem (UESHIMA, 1979). Havendo assim a necessidade de estudos, que auxiliem na elucidação de sua origem e função.

### 1.3. Infraordem Pentatomomorpha

A infraordem Pentatomomorpha possui aproximadamente 15.000 espécies distribuídas em 40 famílias. Todos os insetos desta infraordem são terrestres e a maioria se alimenta de plantas, embora alguns se alimentem de fungos (representantes de Aradoidea), ou são predadores (representantes de Asopinae, subfamília de Pentatomidae) (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Dentro dessa infraordem encontramos algumas famílias economicamente importantes, as quais três merecem destaque: Coreidae, Pentatomidae e Scutelleridae.

A família Coreidae é composta por aproximadamente 1800 espécies, distribuídas em 257 gêneros. Apresentam porte avantajado, cores brilhantes, e a maioria das espécies possui dilatação foliácea nas tíbias do par de pernas posteriores (SCHUH; SLATER, 1995), ficando conhecidos popularmente como insetos de folhas nos pés (HENRY, 2009). São cosmopolitas, contudo mais concentradas em regiões tropicais. Aproximadamente 82 espécies têm sido mencionadas, na literatura, como potencialmente prejudiciais às plantações. 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). Algumas espécies dessa 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). Em relação às características filogenéticas, Li (1996) classifica o grupo como monofilético.

Já a família Pentatomidae possui aproximadamente, 4.500 espécies distribuídas em 760 gêneros (GRAZIA et al., 2008), estando representada nas principais regiões faunísticas do globo terrestre (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). São economicamente importantes, devido ao status de pragas agrícolas ou agentes de controle biológico (PANIZZI et al., 2000). Esses insetos tem um papel importante nas florestas, 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 (BROWN, 1997). De acordo com Schuh e Slater (1995) os limites taxonômicos de Pentatomidae eram bastante controversos e pouco definidos. Todavia, essa família foi reconhecida como grupo monofilético por Grazia et al. (2008) com base em caracteres morfológicos e moleculares.

E por fim, a família Scutelleridae possui 80 gêneros e 450 espécies. A característica mais notável é o escutelo, que sobrepõe todo o abdômen. Nessa família encontramos o percevejo *Pachycoris torridus* presente em praticamente todos os países da América, desde os Estados Unidos até a Argentina (FROESCHNER, 1988). Entretanto, há relatos mais frequentes na América do Sul (PEREDO, 2002), sendo o único percevejo da família Scutelleridae com importância agrícola no Brasil (GALLO et al., 2002). Essa espécie é fitófaga e polífaga, sendo descritos ataques às culturas do arroz (Poaceae), laranja (Rutaceae), caju e manga (Anacardiaceae), araçá, eucalipto e goiaba (Myrtaceae), mandioca e tungue (Euphorbiaceae) (SILVA et al., 1968), acerola (Malpighiaceae) (GALLO et al., 2002), aroeira-vermelha (Anacardiaceae) (SANCHEZ-SOTO et al., 2004), cansanção (Euphorbeaceae) (SANTOS et al., 2005), café (Rubiaceae) (BARBOSA et al., 2011) e principalmente à cultura do Pinhão-mansinho (Euphorbiaceae: *Jatropha curcas*). Podem se alimentar de vários hospedeiros, e assim se manterem durante todo o ano (AVELAR et al., 2007).

#### **1.4. Infraordem Cimicomorpha**

Cimicomorpha compreende mais de 20 mil espécies, distribuídas atualmente em 17 famílias (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Os membros dessa infraordem apresentam os mais variados habitat e hábitos alimentares, incluindo zoofagia e hematofagia em Reduviidae, preferência por fitofagia em Miroidea e ectoparasitismo em Polytctenidae e Cimicidae (SCHUH; SLATER, 1995; SCHUH et al., 2008; USINGER, 1966).

A subfamília Triatominae, pertencente à família Reduviidae (LENT; WYGODZINSKY, 1979) e apresenta destaque em Cimicomorpha, devido à



importância medico-sanitária, pois são vetores da doença de Chagas. A doença de Chagas é um problema de saúde pública na América Latina e está se espalhando, cada vez mais, para novas regiões geográficas, principalmente devido à migração de pessoas infectadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (GASCON et al., 2010; JACKSON et al., 2014).

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é vetorial, por meio das fezes de triatomíneos contaminados com o parasito, pois esses insetos são hematófagos e possuem o hábito de defecar durante o repasto sanguíneo (CHAGAS, 1909; WHO, 2017). O Brasil apresenta grande diversidade de espécies (GALVÃO, 2014) que, em consequência de ações antrópicas (como o desmatamento e as queimadas), estão migrando para o ambiente domiciliar (DIAS; SCHOFIELD, 1998; ALMEIDA et al., 2009).

### **1.5. Infraordem Nepomorpha**

Os Nepomorpha são considerados os verdadeiros percevejos aquáticos, visto que as espécies desta infraordem vivem, em sua maioria, debaixo de água durante todo o ciclo de vida (NIESER; MELO, 1997). Possuem 11 famílias e mais de 2000 espécies ao redor do mundo. Os percevejos aquáticos e semi-aquáticos vivem nos mais diferentes ambientes, sejam eles de água doce, salobra ou salgada, embora sejam principalmente dulciaquícolas. São encontrados, por exemplo, em cachoeiras, córregos, lagos, lagoas, poças temporárias, águas acumuladas em troncos de árvores e bromélias, mangues, oceanos e reservatórios artificiais. Com exceção de Corixidae, que é onívora, todas as demais espécies são predadoras, alimentando-se principalmente de outros invertebrados aquáticos, sendo considerados importantes agentes no controle biológico (MAZZUCCONI et al., 2009).

A infraordem é formada por heterópteros com olhos compostos, antenas mais curtas que a cabeça e muitas vezes ocultas sob ela (NIESER, 1975). Tal característica pode ser uma adaptação para uma forma hidrodinâmica. Além

disso, em *Nepomorpha*, as antenas funcionam como órgão de equilíbrio e as alterações de posição são percebidas pelo órgão de Johnston (NIESER; MELO, 1997).

Já a capacidade de voar não é encontrada em todos os *Nepomorpha*. O polimorfismo dos músculos relacionados ao voo, bem como o das asas, é comumente observado. No que concerne às asas, é possível encontrar tanto indivíduos macrópteros (asas bem desenvolvidas) como braquípteros (asas curtas, sendo as anteriores geralmente com membrana não delimitada e sutura do cório-clavo ausente) dentro da mesma espécie (NIESER; MELO, 1997).

### **1.6. O DNA ribossômico 45S**

As famílias multigênicas são sequências de DNA (genes) que apresentam similaridade estrutural e funcional, originados a partir de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005). Dentre estas sequências, os genes que transcrevem os RNAs ribossomais (RNAr) são constituídos de sequências nucleotídicas muito conservadas evolutivamente e podem ser encontradas em todos os eucariotos, organizadas em dois distintos grupos arranjados em tandem. O maior arranjo (DNAr 45S) é formado pelos genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Estes genes são separados por espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS-Internal Transcribed Spacer), e cada cluster de DNAr 45S é separado por espaçadores transcritos externos (ETS-External Transcribed Spacer) e por espaçadores intergênicos (IGS – Intergenic Spacer), encontram-se em regiões cromossômicas específicas correspondentes às regiões organizadoras de nucléolos (RONs) (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

O outro arranjo é formado pelas sequências dos genes que transcrevem o RNAr 5S. Esses genes são bastante conservados e espaçados por sequências não transcritas (NTS-Non Transcribed Spacer), que são extremamente variáveis em tamanho e composição nucleotídica, e não estão envolvidos na formação das RONs (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

O uso do DNAr 45S tem se mostrado esclarecedor para diversas questões, desde o entendimento da estrutura de diferentes regiões cromossômicas, tais como centrômeros e telômeros, a análises relacionadas à diversificação cariotípica, incluindo cromossomos autossômicos e origem e evolução de cromossomos sexuais e supernumerários. Além disso, o mapeamento físico cromossômico do genoma tem contribuído no entendimento da estrutura e evolução dos genomas dos eucariotos. Em Heteroptera, o uso do mapeamento de DNAr é útil para o entendimento da ampla diversidade cariotípica observada no grupo, sendo esclarecedor dos processos que governam a evolução de seus cariótipos e genomas como um todo (PANZERA et al., 2012).

### **1.7. A Sonda 18S e a Técnica de FISH**

O gene nuclear 18S, possui, cerca de 1.800 a 2.000 pb, apresentando-se muito conservado e, portanto, apropriado para resoluções de filogenias. Esse gene possui informações que permitem avaliar relações entre organismos com tempos de divergência maiores que 100 milhões de anos. Contudo, esse marcador molecular pode também 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) (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

A Técnica de FISH é amplamente realizada utilizando a sonda de DNAr 18S (BARDELLA et al., 2016; CHIRINO et al., 2013; GOLUB et al., 2015). Um exemplo interessante está relacionado às Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs). Muitos estudos realizados com a técnica de FISH mostraram que algumas espécies possuem RONs na região terminal dos cromossomos autossomos ou mesmo dos sexuais (REBAGLIAT et al., 2005).

Entre as infraordens descritas na literatura, os dados com 18S revelaram diversidade no número e localização de clusters na família Tingidae (Cimicomorpha), na qual ocorreram localizações intersticiais e subterminais,

verificou-se que os machos de *Tingis crispata* tinham locais de DNAr em ambos os cromossomos sexuais, sendo intersticial no X e subterminal no Y (GOLUB et al., 2015), e conservação na família Coreidae (Pentatomomorpha), na qual as marcações se deram principalmente nos cromossomos autossomos (BARDELLA et al.; 2016). Há também variação em relação ao número de sinal, com espécies apresentando um, dois ou três sinais de hibridização (BARDELLA et al.; 2016). Assim, os trabalhos citados evidenciam a Técnica de FISH como uma ferramenta eficaz na inferência evolutiva na subordem Heteroptera.

# *Objetivos*

---

## 2 OBJETIVOS

Devido às diversas características peculiares do grupo, como a variabilidade no número de cromossomos, presença de m-cromossomo, diversidade nos mecanismos de determinação do sexo, e demais características citogenéticas, associadas à falta de caracterização do cenário evolutivo do grupo, nossos objetivos foram:

- Observar o padrão evolutivo do DNAr 45S nas espécies *Acantocephala parensis*, *Anasa Bellator*, *Corecoris batatas*, *C. fuscus*, *Dallacoris pictus*, *D. obscura*, *Edessa colaris*, *Leptoglossus zonatus*, *Loxa virescens*, *Lucullia flavovittata*, *Mormidae v-luteum*, *Odmalea* sp., *Pachycory torridus*, *Phitia picta* e *Thyanta perditor*.
- Analisar a disposição da sonda de DNAr 45S nos cromossomos destes Heteroptera;
- Inferir um cenário evolutivo para as infraordens Cimicomorpha, Nepomorpha e Pentatomomorpha, buscando caracterizar os grupos de acordo com a sua divergência evolutiva e organização cariotípica.

# *Material e Métodos*

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico e obtenção de cromossomos

Para os experimentos, foram realizadas coletas manuais dos espécimes, no câmpus da UNESP de São José do Rio Preto-SP (20° 49' 12" S 49° 22' 44" W). Os insetos foram levados ao Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos (LACIMI) do Departamento de Biologia/IBILCE-UNESP. Essas amostras foram separadas por sexo, sendo as fêmeas fixadas em etanol absoluto para análises moleculares, conservados à -20°C e os machos fixados em etanol: ácido acético (3:1), armazenados à temperatura de 4°C, para as análises citogenéticas.

Um total de 150 machos adultos de 15 espécies, foram analisados, sendo nove espécies da família Coreidae (*Acantocephala parensis*, *Anasa bellator*, *Corecoris fuscus*, *C. batatas*, *Dallacoris pictus*, *D. obscura*, *Leptoglossus zonatus*, *Lucullia flavovittata* e *Phitia picta*), cinco espécies de Pentatomidae (*Edessa colaris*, *Loxa virencis*, *Mormidae v-luteum*, *Odmalea sp* e *Thyanta perditor*) e uma espécie da família Scutelleridae (*Pachycoris torridus*).

Toda a parte prática dos experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética Molecular da UNESP de Rio Claro, com auxílio e orientação do Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello. Os insetos machos adultos foram dissecados, já que a espermatogênese em Heteroptera não se encerra no estágio ninfal. Para a dissecação o inseto foi fixado com um alfinete na região posterior do cefalotórax, em uma placa de Petri, contendo parafina sólida e tiveram suas pernas, asas e escutelo retirados e as laterais do abdome seccionados. Foi gotejada uma gota da solução de Carnoy (etanol absoluto: ácido acético, 3:1), sobre os órgãos expostos, que foram removidos com auxílio de um estilete, deixando evidente os testículos. Os testículos, localizados latero-ventralmente, foram mantidos em sua posição por meio de ramificações dos troncos das traqueias dos respectivos segmentos. Uma membrana



denominada bainha peritoneal envolve os testículos em cujo interior localizam-se as células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento. As lâminas foram preparadas usando uma porção do testículo, que foi macerado e dilacerado em ácido acético a 50% e, em seguida, seco em uma placa aquecedora a 45-50°C.

### 3.2. Isolamento do DNA

O DNA foi obtido a partir de uma amostra do tecido muscular da espécie *Mormidae v-luteum*. A amostra foi digerida com proteinase K durante 3 h, foi adicionado fenol/Tris-HCl, pH 8,0, seguido por centrifugação e lavagem com fenol/Tris-HCl, pH 8,0 e álcool isoamílico-clorofórmio. Após a centrifugação, foi adicionado álcool isoamílico-clorofórmio e o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado, durante 12 h à temperatura de -20°C e eluído em Tris EDTA (TE; 1:10) + RNase. As sondas do 18S foram geradas por reação em cadeia da polimerase (PCR), através do uso dos *primers*: *Foward* 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3' e *Reverse* 5'-CTGAGATCCAACTACGAGCTT-3' (BARGUES; MAS-COMA, 1997).

Os fragmentos obtidos foram purificados e sequenciados. As sequências foram submetidas ao nucleótido BLAST (ZHANG et al., 2000) e a identidade das sequências foi confirmada.

### 3.3. Hibridização *in situ* Fluorescência

O FISH foi realizado de acordo com Pinkel et al. (1986), com modificações de Cabral-de-Mello et al. (2010). A sonda de DNAr 18S obtida de *Mormidae v-luteum* foi utilizada em todos os insetos. Os fragmentos de DNA foram marcados com biotin-14-dUTP (Invitrogen) através de PCR e os produtos visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a amplificação das sequências. Os sinais da FISH foram detectados utilizando alexa-fluor-488 (Life Technologies) e as preparações foram contra coradas com

4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) e, posteriormente, montadas usando Vecta shield (Vector). As imagens foram capturadas em escala de cinza utilizando uma câmera digital refrigerada DP70 acoplada a um microscópio Olympus BX51 equipado com uma lâmpada de fluorescência e filtros apropriados. As imagens foram pseudo-coloridas, mescladas e tratadas para brilho e contraste com Adobe Photoshop CS6.

# *Resultados e Discussão*

---

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão da presente tese estão apresentados no manuscrito a seguir submetido à revista ***Plos One*** (ISSN: 1932-6203).

#### **4.1 Capítulo 1: Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Heteroptera based on the chromosomal location of ribosomal genes**

Tatiani Seni de Souza Firmino, Diogo Cavalcanti Cabral de Mello, Mary massumi Itoyama

Manuscrito submetido à revista *Plos One* (FI 2,76)

**CAPÍTULO 1. Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Heteroptera (Insecta, Hemiptera) based on the chromosomal location of ribosomal genes**

Tatiani Seni de Souza-Firmino<sup>1\*</sup>, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello<sup>2</sup>, Mary Massumi Itoyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Rio Claro, Av. 24-A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

Short title: **Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Heteroptera**

\* **Corresponding author:** Tatiani Seni de Souza-Firmino, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, Rua Cristovão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: tatseni@hotmail.com. Phone: +55-17-997325374.

## Abstract

With the objective of assisting in the understanding of the chromosome evolution of Heteroptera and in the quest to understand how the genome organizes/reorganizes for the chromosomal position of the 45S rDNA, we analyzed 15 species of Heteroptera grouped in the Pentatomomorpha infraorder with the probe of 18S rDNA and we compare our results with those described in the literature for Pentatomomorpha, Cimicomorpha and Nepomorpha infraorders. The mapping of the 45S gene in the Coreidae family demonstrated that the species presented markings on the autosomes, with the exception of *Acantocephala parensis* and *Leptoglossus gonagra* that showed markers on m-chromosomes. Most species of the Pentatomidae family showed marking in the autosomes, except for two species that had 45S rDNA on X sex chromosome (*Odmalea* sp. and *Graphosoma lineatum*) and two that showed marking on the X and Y sex chromosomes. Species of the Pyrrhocoridae family showed 18S rDNA markers in autosomes, X chromosome as well as in Neo X. The Largidae and Scutelleridae families were represented by only one species that showed marking on the X sex chromosome and on a pair of autosomes, respectively. The study of ribosomal genes in the Nepomorpha infraorder is restricted to the knowledge of the markers in six species of the Belostomatidae family (marking on the autosomes or sex chromosomes) and in the Cimicomorpha infraorder showed great variability for the 45S gene, including intraspecific: Miridae and Cimicidae presented markings restricted to sex chromosomes and Tingidae and Reduviidae showed markers on the autosomes and/or sex chromosomes. Based on this, we characterized the arrangement of 45S DNAr in the chromosomes of Heteroptera and discussed the main evolutionary events related to the genomic reorganization of these species during the events of chromosome and karyotype evolution in Pentatomomorpha, Cimicomorpha and Nepomorpha infraorders.

**Keywords:** Pentatomomorpha; Cimicomorpha; Nepomorpha; FISH; 45S rDNA

## Introduction

The Heteroptera suborder (Insecta, Hemiptera) is the largest and most diverse group of insects with incomplete metamorphosis, being formed by seven infraorders (Leptopodomorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Pentatomomorpha, Cimicomorpha, Dipsocoromorpha and Enicocephalomorpha) composed of more than 40,000 species distributed in approximately 80 families [1, 2]. These insects of medical and agricultural importance have a great diversity of habitats (aquatic, terrestrial and parasitic of birds and bats) and they present different feeding habits, such as phytophagous, predators, necrophagous and hematophagous [1].

The heteropteran can cause great damage to agricultural production, act on the transmission of phytopathogens and, mainly, can transmit zoonoses, such as Chagas disease [1, 3]. However, not all species of Heteroptera are harmful, because there are examples that act in the biological control of agricultural pests, as well as in environmental bioindication, increasing or decreasing the diversity of species when great environmental disturbances occur [1, 4].

The first cytogenetic studies in Heteroptera were initiated in 1891 with the description of the spermatogenesis of *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae) [5]. Posteriorly, several chromosomal and karyotype analyzes were performed, with emphasis on the characterization of the chromosome number, relative size of the autosomes and sex chromosomes and description of the sex-determination system [6-8]. These insects of medical and agricultural importance have unique chromosomal characteristics as holocentric chromosomes, micro chromosomes (m-chromosomes), which are generally equiasmatic during the onset of prophase I, inverted meiosis for sex chromosomes and end-to-end pairing [6,7,9,10].

The diploid number of chromosomes in Heteroptera varies from  $2n = 4$  [*Lethocerus* sp. (Hemiptera, Belostomatidae)] at  $2n = 80$  [*Lopidea marginalis* (Hemiptera, Miridae)], with the majority of species from 12 to 34 chromosomes



(70% of species), being the most common diploid number of  $2n = 14$  (460 species) [10]. Chromosomal sex-determination system mechanisms known are divided into simple [ $XY/XX$  (71.4%) and  $X_0/XX$  (14.7%)] and multiples [ $X_nY/X_nX_n$ ,  $X_n0/X_nX_n$  and  $XY_n/XX$  (13.5%)] [6,7]. In addition, there is the Neo XY system that basically is the fusion of sex chromosomes X or Y with autosomes [10].

The most primitive superfamilies (Nepoidea and Gelastocoroidea) present chromosomal sex-determination system simple and multiple with presence of the Y sex chromosome ( $XY$  and  $X_nY$ ) and the most recent superfamilies (Naucoroidea and Notonectoidea) present a pair of m-chromosomes and different chromosomal sex-determination system ( $X_0$  and  $X_1X_20$ ) [11-13]. Cytogenetic analyzes suggest that the absence of m-chromosomes and the presence of Y sex chromosomes could be considered plesiomorphic characters, because it is believed that the sex systems  $X_0$  and  $X_1X_20$  originated through the loss of the Y sex chromosome (aneuploidy), as well as loss of Y followed by fragmentation of the X chromosome, respectively [13]; those sex-determination systems together with the presence of a pair of m-chromosomes could be considered as derived characters [13].

Fusion (simploidy) and fission (agmatoploidy), together with aneuploidies, are the main mechanisms of evolution of the karyotype in Heteroptera [6,7,14,15,16], which support the probable sex systems  $X_nY$ ,  $X_0$  and  $X_1X_20$ , as well as Neo XY, from the simple sex determination system ( $XY$ ) [14, 17].

In relation to the infraorder of Heteroptera, there are currently three hypotheses: Sherbakov and Popov [18] and Mahner [12] were congruent in the hypotheses proposals, they proposed that Nepomorpha is a sister group of the remainder of Heteroptera. The other two hypotheses correspond to Wheeler et al. [19] and Xie et al. [20] that demonstrated that all infraordens are monophyletic with a phylogenetic relationship between Enicocephalomorpha (Nepomorpha (Leptopodomorpha (Gerromorpha + Dipsocoromorpha) + (Cimicomorpha + Pentatomomorpha))) for Xie et al. [20] and

Enicocephalomorpha (Dipsocoromorpha (Gerromorpha (Nepomorpha (Leptopodomorpha (Cimicomorpha + Pentatomomorpha)))) for Wheeler [19], resulting in new questions about the evolutionary relations of these infraorders [2].

Because of these inconsistencies, the use of complementary techniques such as classical and molecular cytogenetic analyzes, can help to elucidate the relationships between species, contributing to phylogenetic, evolutionary and taxonomic studies [6, 7, 13, 21-24]. The use of fluorescent in situ hybridization (FISH) allows mapping of specific DNA sequences in the chromosomes of the species [25]. With the understanding of the number and location of ribosomal DNA (rDNA) regions, for example, it is possible to establish the phylogenetic relationship, helping in the understanding of the diversification of the insects of the Heteroptera suborder, as well as in the characterization of the events related to the evolution of the genome of these insects [22-24, 26, 27].

The chromosome mapping has been usually performed in Heteroptera, being the study of the number and location of the 45S ribosomal genes the most frequent [22-24, 26, 27]. This gene generally appears as repeated sequences and grouped into particular chromosomes, especially at the ends of autosomes and/or sex chromosomes [22-24, 26-28]. In different groups of insects, such as Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera and Orthoptera, the distribution of 45S rDNA has been applied with the objective of assisting in phylogenetic, taxonomic and evolutionary studies [22-24, 26, 29-34].

For the chromosomal mapping of the 45S ribosomal gene in Heteroptera, the 18S rDNA probe has been widely used [22-23, 26, 28, 35, 36]. With the objective of assisting in the understanding of the chromosome evolution of Heteroptera and in the quest to understand how the genome organizes/reorganizes for the chromosomal position of the 45S rDNA, we analyzed 15 species of Heteroptera grouped in the Pentatomomorpha infraorder with the probe of 18S rDNA and we compare our results with those described in the literature for Pentatomomorpha, Cimicomorpha and

Nepomorpha infraorders, in order to elucidate evolutionary, phylogenetic and taxonomic issues of these insects of medical and agricultural importance.

## **Methods**

### **Animals**

A total of 150 adult males of 15 species were analyzed: nine species of Coreidae family (*Acanthocephala parensis*, *Anasa bellator*, *Corecoris fuscus*, *C. batatas*, *Dallacoris pictus*, *D. obscura*, *Leptoglossus zonatus*, *Lucullia flavovittata* and *Phthia picta*), five species of Pentatomidae (*Edessa collaris*, *Loxa virescens*, *Mormidea v-luteum*, *Odmalea* sp. e *Thyanta perditor*) and one species of the Scutelleridae family (*Pachycoris torridus*). The insects were collected by active search in the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE/UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil (geographical coordinates: Latitude: -20.802, Longitude: -49.3707 20° 49' 13" South, 49° 22 '47' 'West) during the period from March 2015 to May 2018.

### **Chromosome preparations**

The insects were dissected, the testes were removed and fixed in Carnoy's solution (absolute ethanol: acetic acid, 3: 1). The slides were prepared using a portion of the testis which was macerated in 50% acetic acid and then dried on a hot plate at 45-50° C.

### **DNA isolation**

The DNA was obtained from a sample of muscle tissue of the *M. v-luteum* species. The sample was digested with proteinase K for 3 h, was added phenol/Tris-HCl, pH 8.0, followed by centrifugation and washing with phenol/Tris-HCl, pH 8.0 and isoamyl alcohol-chloroform. After centrifugation, isoamyl alcohol-chloroform was added and the DNA was precipitated with ice-

cold absolute ethanol for 12h at -20° C and eluted in Tris EDTA (TE; 1:10) + RNase. The 18S rDNA probes were generated by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the primers: Forward 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3' and Reverse 5'-CTGAGATCCAACACTACGAGCTT-3' [37]. The obtained fragments were purified and sequenced. The sequences were subjected to the BLAST nucleotide [38] to confirm the identity of these sequences.

### **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

FISH was performed according to Pinkel et al. [39], with modifications of Cabral-de-Mello et al. [40]: the 18S rDNA probe obtained from *M. v-luteum* was used in all insects analyzed. The DNA fragments were labeled with biotin-14-dUTP (Invitrogen) by PCR and the products visualized by 1% agarose gel electrophoresis to verify the amplification of the sequences. FISH signals were detected using alexa-flu-488 (Life Technologies) and the preparations were stained with 4', 6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and then assembled using Vecta shield (Vector). The preparations were observed using an Olympus BX61 Fluorescence microscope with DP70 refrigerated digital camera. Images were merged and optimized for brightness and contrast using Adobe Photoshop CS2 software.

### **Results and Discussion**

For the first time, we characterize the number and distribution of the 45S DNAr for 15 species belonging to three families of the Pentatomomorpha (nine species of Coreidae, five of Pentatomidae and one of Scutelleridae) (Table 1) and compared with other 119 species of the literature belonging to the Pentatomomorpha (Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Rhopalidae and Scutelleridae families) (Table 1), Nepomorpha (Belostomatidae family) (Table 2) and Cimicomorpha infraorders (Cimicidae, Miridae, Reduviidae and Tingidae families) (Table 3).

With regard to the diploid chromosome complements of the Pentatomomorpha infraorder, the representatives of the Coreidae family presented karyotype ranging from  $2n = 15$  to  $27$ , with sex-determination system XX/XO and presence of m-chromosomes (except *Acanonicus hahni*) (table 1). The Pentatomidae and Scutelleridae families had the same number of chromosomes, namely,  $2n = 14$  ( $12A + XY$ ) and sex-determination system XX/XY (Table 1). Pyrrhocoridae presented a karyotype varying from  $2n = 12$  to  $18$ , with chromosomal of sex-determination system XY, X0 and Neo XY (Table 1), the Rhopalidae, Largidae and Lygaeidae families presented sex-determination system X0, X0 and XY, respectively (Table 1), being detected m-chromosomes in Rhopalidae and Lygaeidae (Table 1). In the Nepomorpha infraorder the chromosome number ranged from  $2n = 8$  to  $29$ , with sex-determining systems XY or  $X_nY$  ( $X_1X_2Y$ ) (Table 2) and in the Cimicomorpha infraorder, the karyotypes ranged from  $2n = 14$  to  $34$ , with the XY or  $X_nY$  sex-determination system (XY,  $X_1X_2Y$  and  $X_1X_2X_3Y$ ), with only two species of the Miridae family showing m-chromosomes (Table 3).

The mapping of the 45S gene in the Coreidae family demonstrated that the species presented markings on the autosomes (Table 1, Figure 1b-i), with the exception of *A. parensis* and *Leptoglossus gonagra* that showed markers on m-chromosomes (Table 1, Figure 1a). Taking into account that Coreidae is a monophyletic group [51] and that most species of this family share m-chromosomes, sex-determination system X0 and presence of the 45S gene in a pair of autosomes (Table 1), we suggest that the main events that led to numerical variation in the karyotype of these insects came from agmatoploidy/simploidy in the autosomes.

The FISH markings on m-chromosomes for *A. parensis* and *L. gonagra* (Table 1) when associated with the monophyly of the Coreidae family [51] allows us to propose that these chromosomes have an autosomal origin, since all other species of the Coreidae family showed marking in a pair of autosomes (Table 1) and agmatoploidy events are relatively common in holocentric chromosomes [16]. In addition, although Bressa et al. [52] emphasize that

nothing can still be said about the information that m-chromosomes carry or what their function might be in the genetic system of the species that possess them, our results demonstrate that these chromosomes have transcriptional activity (in this case, related to ribosomal biosynthesis by the presence of the 45S gene [53]), contributing, substantially, with the knowledge about these chromosomes little studied.

Most species of the Pentatomidae family showed marking in the autosomes (Table 1, Figure 2b-e), except for two species that had 45S rDNA on X sex chromosome (*Odmalea* sp. and *Graphosoma lineatum*) (Table 1, Figure 2a) and two that showed marking on the X and Y sex chromosomes (*Eurydema oleracea* and *Oebalus poecilus*) (Table 1). Rebagliati et al. [54] proposed that the maintenance of the chromosome number in Pentatomidae is associated with genomic stability. However, Bardella et al. [27] from the results of the rDNA mapping suggest that although the chromosome number is constant, different mechanisms of genomic reorganization are in place, causing amplification and dissemination of repetitive DNAs without the occurrence of macro-chromosomal alterations. Different from that observed for Coreidae, which justifies the variation of the locations of the ribosomal gene based on chromosomal breaks, on the basis of karyotypic stability ( $2n = 14$ ) and the monophyletic origin of the Pentatomidae [55], we suggest that the mechanisms that led to the 45S gene diversification in this family are related to transposition elements (TEs), as suggested by Panzera et al. [22] and Pita et al. [23, 24] for the chromosome diversification of triatomines.

Species of the Pyrrhocoridae family showed 45S rDNA markers in autosomes, X chromosome as well as in Neo X (Table 1). Analyzing specifically the species of the *Dysdercus* genus, all species (except *Dysdercus albofasciatus*) present  $2n = 13$  ( $12 + X0$ ) chromosomes and FISH labeling in a pair of autosomes (Figure 1). Based on the origin of the sex chromosomes NeoX and NeoY (from the fusion of the X or Y chromosome with an autosomes [10]) and on the karyotype and chromosomal homogeneity of the *Dysdercus* genus, our results suggest that possibly the ancestor of the species of this

genus presented a sex-determination system XY and the chromosomal diversification derived in two different ways: i) an aneuploidy event occurred for the Y chromosome which resulted in the X0 sex determination system and ii) a simploidy event occurred between the XY sex chromosome pair and the pair of autosomes that had the 45S gene and subsequently there was loss of the ribosomal locus of the neo Y chromosome. The first hypothesis can be supported by the fact that other species of the Pyrrhocoridae family present a sex-determination system XY (Table 1) and the second hypothesis is based on the heterochromatic nature of the X sex chromosome of the insects of the Pentatomomorpha infraorder [7], because with the intention of minimizing the deleterious effects of TEs, they are often directed to regions of heterochromatin [56, 57]. This same hypothesis of transfer of 45S rDNA by TEs and subsequent loss of the ribosomal gene was used by Pita et al. [24] to explain the diversification of ribosomal genes in triatomines of the Rhodniini tribe.

The Largidae and Scutelleridae families were represented by only one species that showed marking on the X sex chromosome (Table 1) and on a pair of autosomes (Table 1, Figure 2f), respectively. Although they are initial characteristics important and shared with other families of the Pentatomomorpha infraorder (Table 1), new species should be analyzed for evolutionary inferences to be made.

The study of ribosomal genes in the Nepomorpha infraorder is restricted to the knowledge of the markers in six species of the Belostomatidae family (Table 2). Taking into account that all species are in the same genus, we can suggest that the events of agmatoploidy and simploidy that led to the numerical alteration during the karyotypic evolution of *Belostoma* [58] are associated with evolutionary events of genomic reorganization associated with TEs (which resulted in passage in the locus of the autosomes to the sex chromosomes), since only the two species with different chromosome numbers are marked on the sex chromosomes (Table 2). In addition, unlike the one observed in the Pentatomomorpha infraorder (Table 1), most *Belostoma* species present marking in only 1 cluster.

The Cimicomorpha infraorder showed great variability for the 45S gene, including intraspecific (Table 3). Miridae and Cimicidae presented markings restricted to sex chromosomes (Table 3). Tingidae and Reduviidae showed markers on the autosomes and/or sex chromosomes (Table 3). The Reduviidae are the group of Heteroptera that present more species that present the chromosomal mapping for the 45S gene described, being observed markings in autosomes, on the X sex chromosome, in both sex chromosomes (X and Y), in only one of the X sex chromosomes (when there is fragmentation of the sex chromosome) and a pair of autosomes plus one of the sex chromosomes (Table 3). It is suggested that for several orders of insects (including Hemiptera) that this variability comes from events of ectopic recombination and/or movement associated with TEs [22-24, 31, 32, 59].

Considering the autosomal position as the ancestral character of Hemiptera, Pita et al. [23] suggest that the movement of rDNA loci from autosomes to sex chromosomes quickly established reproductive barriers between divergent lineages. They also proposed that translocation of the rDNA from the autosomes to the sex chromosomes would restrict reproductive compatibility and eventually promote speciation. In addition, they report that 45S rDNA analysis in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) suggests that each species tends to fix its chromosome position (species-specific characteristic), so that groups with a common ancestry tend to have the same chromosomal location for rDNA (for example, *Rhodnius* spp. with marking on sex chromosomes [24], *Panstrongylus* spp. with markings on a pair of autosomes [22] and several monophyletic groups of *Triatoma* (termed subcomplexes) that share chromosomal imprints of 45 rDNA in the same region [22, 24].

## Conclusions

Based on this, we characterized the arrangement of 45S DNA in the chromosomes of Heteroptera and discussed the main evolutionary events related to the genomic reorganization of these species during the events of



chromosome and karyotype evolution in Pentatomomorpha, Cimicomorpha and Nepomorpha infraordens.

### **Acknowledgments**

This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Financing Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2016/10135-9) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **References**

1. Schuh RT, Slater JA. True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History). Ithaca, London: Cornell University Press. 1995.
2. Weirauch C, Schuh RT. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. *Annu Rev Entomol.* 2011;56: 487-510.
3. Chagas, C. Nova tripanozomiose humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1909;1: 159-218.
4. Fauvel G. Diversity of heteroptera in agroecosystems: role of sustainability and bioindication. *Agricult Ecosyst and Environment.* 1999;74: 275-303.
5. Henking H. Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten I1 Über spermatogoniose und Beziehung zur Eientwicklung bei *Dyrrhocoris apterus*. *Z. Wiss. Zool.* 1891;51: 685-736.

6. Ueshima N. Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma*. 1966;18: 97-122.
7. Ueshima N. Hemiptera II: Heteroptera. In: John, B. (Ed.). *Animal cytogenetics*, Berlin & Stuttgart: Gebrüder Borntraeger. 1979;3: 113.
8. Alevi KCC, Moreira FFF, Jurberg J, Azeredo-Oliveira MTV. Description of diploid chromosome set of (Hemiptera, Triatominae) *Triatoma pintodiasi*. *Genet Mol Research*. 2016;15: 1-9.
9. Wilson EB. The female chromosome groups in *Syromastes* and *Pyrrhocoris*. *Biological bulletin*. 1909;16: 199-204.
10. Papeschi AG, Bressa MJ. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *J Biol Res*. 2006; 5: 3-21.
11. Rieger C. Skelett und Muskulatur des Kopfes und Prothorax von *Ochterus marginatus* Latreille. *Zoomorphologie*. 1976; 83, 109-191.
12. Mahner M. Systema cryptoceratorum phylogenicum (Insecta, Heteroptera). *Zoologica*. 1993;143: 1-302.
13. Papeschi AG, Bressa MJ. Classical and molecular cytogenetics in Heteroptera. *Res Adv Entom*. 2006; 1: 1-9.
14. Papeschi AG. Sex chromosome polymorphism in a species of *Belostoma* (Belostomatidae, Heteroptera). *Hereditas*. 1996; 124: 269-274.
15. Thomas DBJ. Chromosome evolution in the Heteroptera (Hemiptera): agmatoploidy versus aneuploidy. *Ann Entomol Soc Am*. 1987;80: 720-730.

16. Alevi KCC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype Evolution of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99: 87-89.
17. Jacobs DH. The evolution of a neo-XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae). *Chromosome Res.* 2004;12: 175-191.
18. Scherbakov DE, Popov YA. Superorder Cimicidea Laicharting, 1781. Order Hemiptera Linne, 1758. The bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. In: Rasnitsyn AP, Quicke DLJ, editors. *History of Insects*. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic. 2002; 143-157.
19. Wheeler WC, Schuh RT, Bang R. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Insec Syst Evol*, 1993:121-137.
20. Xie Q, Tian Y, Zheng L, Bu W. 18S rDNA hyperlongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). *Mol Phylogenet Evol.* 2008;47: 463-471.
21. Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet. Genome Res.* 2010;128: 77-87.
22. Panzera Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Pérez R. High dynamics of rDNA *cluster* location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res.* 2012;138: 56-67.

23. Pita S, Lorite P, Nattero J, Galvão C, Alevi KCC, Teves SC, Azeredo-Oliveira MTV, Panzera F. New arrangements on several species sub complexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect Genet and Evol.* 2016;43: 225-231.
24. Pita S, Panzera F, Ferrandis I, Galvão C, Gómez-Palacio A. Chromosomal divergence and evolutionary inferences of Rhodniini based in chromosome location of the ribosomal genes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108: 376–382.
25. Galián J, Serrano J, La Rúa P, Petit Pierre E, Juan C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). *Heredity.* 1995;74: 524-530.
26. Bardella VB, Fernandes T, Vanzela ALL. The conservation of number and location of 18S sites indicates the relative stability of rDNA in species of Pentatomomorpha (Heteroptera). *Genome.* 2013;56: 425-429.
27. Bardella VB, Fernandes JAM, Cabral-de-Mello DC. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. *Mol Gen Genomics.* 2016;291: 1919-1925.
28. Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA. Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)<sub>n</sub> repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comp Cytogenet.* 2011;5: 355-374.
29. Hirai H, Yamamoto MT, Taylor RW, Imai HT. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma.* 1996;105: 190-196.

30. Proença SJR, Collares-Pereira MJ, Serrano ARM. Chromosome evolution in tiger beetles: karyotypes and localization of 18S rDNA loci in Neotropical Megacephalini (Coleoptera, Cicindelidae). *Genet Mol Biol.* 2005;28: 725-733.
31. Cabrero J, Camacho JP. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res.* 2008;16: 595-607.
32. Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenet Genome Res.* 2011;134: 127-135.
33. Roy V, Monti-Dedieu L, Chaminade N, Siljak-Yakovlev S, Aulard S, Lemeunier F, Montchamp-Moreau C. Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *Ananassae* and *Melanogaster*. *Heredity.* 2005;94: 388-395.
34. Šíchová J, Nguyen P, Dalíková M, Marec F. Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS One.* 2013;8: 64520.
35. Chirino MG, Papeschi AG, Bressa MJ. The significance of cytogenetics for the study of karyotypes evolution and taxonomy of water bugs (Heteroptera, Belostomatidae) native to Argentina. *Comp Cytogenet.* 2013;7: 111-129.
36. Golub NV, Golub VB, Kuznetsova VG. Variability of 18S rDNA loci in four lace bug species (Hemiptera, Tingidae) with the same chromosome number. *Comp Cytogenet.* 2015;9: 513-522.
37. Bargues MD, Mas-Coma S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1997;14: 569-577.

38. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 2000;7: 203-214.
39. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;8: 2934-2938.
40. Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity.* 2010;104: 393-400.
41. Papeschi AG, Mola LM, Bressa MJ, Greizerstein EJ, Lía V, Poggio L. Behavior of ring bivalents in holokinetic systems: alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentines* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 2003;11: 725-733.
42. Bressa MJ, Franco MJ, Toscani MY, Papeschi AG. Heterochromatin heteromorphism in *Holhymenia rubiginosa* (Heteroptera: Coreidae) *European J. Entomol.* 2008;105: 65-72.
43. Cattani MV, Papeschi AG. Nucleolus organizing regions and semipersistent nucleolar during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae: Heteroptera). *Hereditas.* 2004;140: 105-111.
44. Bressa MJ, Papeschi AG, Vítková M, Kubíčková S. Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenet. Genome Res.* 2009;125: 292-305.

45. Bardella VB, Sampaio TR, Venturelli NB, Giuliano-Caetano L, Fernandes JAM, Rosa R. Physical mapping of 18S rDNA and heterochromatin in species of family Lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera). *Genet Mol Res.* 2014;13: 2186-2199.
46. Grozeva S, Kuznetsova V, Anokhin B. Bed bug cytogenetics: karyotype, sex chromosome system, FISH mapping of 18S rDNA, and male meiosis in *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera: Cimicidae). *Comp Cytogenet.* 2010;4: 151-160.
47. Poggio MG, Bressa MJ, Papeschi AG. Male meiosis, heterochromatin characterization and chromosomal location of rDNA in *Microtomus lunifer* (Berg, 1900) (Hemiptera, Reduviidae, Hammacerinae). *Comp Cytogenet.* 2011;5: 1-22.
48. Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV. Differential characterization of holokinetic chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Gen Mol Res.* 2007;6: 713-720.
49. Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela ALL, Azeredo-Oliveira MTV. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comp Cytogenet.* 2010;4: 141-149.
50. Panzera F, Pita S, Nattero J, Panzera Y, Galvão C, Chavez T, Rojas de Arias A, Cardozo Téllez L, Noireau F. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit Vectors.* 2015;8: 495.
51. Li XZ. Cladistic analysis and higher classification of coreoidea. *Entomol Sin.* 1996;3:283-292.

52. Bressa MJ, Larramendy M, Papeschi AG. Heterochromatin characterization in five species of Heteroptera. *Genetica*. 2005;124: 307-317.
53. McConkey EH, Hopkins JW. The relationship of the nucleolus to the synthesis of ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1964;51: 1197-1204.
54. Rebagliati PJ, Mola ML, Papeschi AG, Grazia J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review, *J Zool Syst Evol Res*. 2005;43: 199-213.
55. Grazia J, Schuh RT, Wheeler WC. Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). *Cladistics*. 2008;24: 932-976.
56. Dai J, Xie W, Brady TL, Gao J, Voyatas DF. Phosphorylation regulates integration of the yeast Ty5 retrotransposon into heterochromatin. *Mol Cell*. 2007;20: 289-299.
57. Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 615-627.
58. Bardella VB, Dias AL, Giuliano-Caetano L, Ribeiro JRI, Rosa R. Sex chromosome differentiation in *Belostoma* (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae) *Genet Mol Res*. 2012;11 2476-2486.
59. Gunderina L, Golygina V, Broshkov A. Chromosomal organization of the ribosomal RNA genes in the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). *Comp Cytogenet*. 2015;9: 201-220.



## Tables

**Table 1.** Chromosomal complement, number of clusters and chromosomal pair where there was the labeling of 45 rDNA in the infraorder Pentatomomorpha. A: autosomes, X: X sex chromosome, Y: Y sex chromosome.

<b>Pentatomomorpha Infraorder</b>	<b>Karyotype</b>	<b>Number of Clusters</b>	<b>FISH (45S rDNA)</b>	<b>References</b>
<b>Coreidae family</b>				
<i>Corecoris batatas</i>	2n= 24 (21 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>C. fuscus</i>	2n= 24 (21 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>Dallacoris pictus</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>D. obscura</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>Hypselonotus interruptus</i>	2n= 19 (16 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>H. fulvus</i>	2n= 19 (16 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Anasa bellator</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>Zicca annulata</i>	2n= 23 (20 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Z. nigropunctata</i>	2n= 23 (20 + 2 m +X0)	2	A	[27]
<i>Althos obscurator</i>	2n=25 (22 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Lucullia flavovittata</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	Present study
<i>Acanthocephala parensis</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	m-chromosome	Present study
<i>Leptoglossus gonagra</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	m-chromosome	[26]
<i>L. zonatus</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	[26], Present study
<i>L. neovexillatus</i>	2n= 21 (18 + 2 m +X0)	2	A	[27]
<i>Anisoscelis foliaceus</i>	2n= 27 (24 + 2 m + X0)	2	A	[27]
<i>Holhymenia histrio</i>	2n=27 (24 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Spartocera fusca</i>	2n=23 (20 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Chariesterus armatus</i>	2n= 25 (22 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Phitia picta</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	[26], Present study
<i>Athaumastus haematicus</i>	2n= 21 (18 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Acanonicus hahni</i>	2n=19 (18 + X0)	2	A	[26]
<i>Cebrenis</i> sp.	2n= 23 (20 + 2m + X0)	2	A	[26]
<i>Pachylis argentinus</i>	2n=15 (12 + 2m + X0)	2	A	[41]
<i>Holhymenia rubiginosa</i>	2n= 27 (24 + 2m + X0)	-	A	[42]
<i>Camptischium clavipes</i>	2n=21 (18 + 2m + X0)	2	A	[43]
<i>Machtima crucigera</i>	2n=21 (18 + 2 m + X0)	2	A	[27]
<b>Pentatomidae family</b>				
<i>Loxa virescens</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	Present study
<i>Mormidae v-luteum</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	Present study
<i>M. notulifera</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[27]
<i>Arvelius albopunctatus</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]

<i>Thyanta perditor</i>	2n= 14 (12 + XY)	2	A	Present study
<i>Odmalea</i> sp.	2n= 14 (12 + XY)	2	X	Present study
<i>Antiteuchus tripterus</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]
<i>Euschistus cornutus</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]
<i>E. heros</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]
<i>Edessa colaris</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	Present study
<i>E. rufomarginata</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]
<i>E. impura</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[26]
<i>E. meditabunda</i>	2n=14 (12 + XY)	-	A	[26]
<i>Eurydema oleracea</i>	2n=14 (12 + XY)	2	X and Y	[28]
<i>Graphosoma lineatum</i>	2n=14 (12 + XY)	1	X	[28]
<i>Nezara viridula</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[41]
<i>Oebalus poecilus</i>	2n=14 (12 + XY)	4	A, X and Y	[27]
<i>Proxysalbo punctulatus</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	[27]
<b>Rhopalidae family</b>				
<i>Harmostes prolixus</i>	2n=13 (10 + 2m + X0)	2	A	[26]
<b>Pyrrhocoridae family</b>				
<i>Dysdercus ruficollis</i>	2n=13 (12 + X0)	2	A	[44]
<i>D. imitator</i>	2n= 13 (12 + X0)	2	A	[26]
<i>D. fulvoniger</i>	2n=13 (12 + X0)	2	A	[26]
<i>D. albofasciatus</i>	2n=12 (10 + NeoXY)	2	neo X	[44]
<i>D. chaquensis</i>	2n=13 (12 + X0)	2	A	[44]
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	2n=21 (22 + X0)	2	X	[28]
<i>Oncopeltus femoralis</i>	2n=18 (16 + XY)	-	A	[45]
<i>Ochrinnus sagax</i>	2n=14 (12 + XY)	-	A	[45]
<i>Lygaeus peruvianus</i>	2n=12 (10 + XY)	-	A	[45]
<b>Largidae family</b>				
<i>Euryophthalmus rufipennis</i>	2n=13 (12 + X0)	1	X	[26]
<b>Lygaeidae family</b>				
<i>Oxycarenus lavaterae</i>	2n=18 (14 + 2m + XY)	2	A	[28]
<b>Scutelleridae family</b>				
<i>Pachycoris torridus</i>	2n=14 (12 + XY)	2	A	Present study

**Table 2.** Chromosomal complement, number of clusters and chromosomal pair where there was the labeling of 45 rDNA in the infraorder Nepomorpha. A: autosomes, X: X sex chromosome, Y: Y sex chromosome.

<b>Nepomorpha Infraorder</b>	<b>Karyotype</b>	<b>Number of Clusters</b>	<b>FISH (45S rDNA)</b>	<b>References</b>
<b>Belostomatidae family</b>				
<i>Belostoma oxyurum</i>	2n = 8 (6 + XY)	-	X and Y	[13]
<i>B. micantulum</i>	2n = 16 (14 + XY)	-	X and Y	[13]
<i>B. elegans</i>	2n = 29 (26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	-	A	[35]
<i>B. dentatum</i>	2n = 29 (26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	1	A	[35]
<i>B. elongatum</i>	2n = 29 (26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	1	A	[35]
<i>B. gestroi</i>	2n = 29 (26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	1	A	[35]

**Table 3.** Chromosomal complement and chromosomal pair where there was the labeling of 45 rDNA in the infraorder Cimicomorpha. A: autosomes, X: X sex chromosome, Y: Y sex chromosome, S: sex chromosome.

<b>Cimicomorpha Infraorder</b>	<b>Karyotype</b>	<b>FISH (45S rDNA)</b>	<b>References</b>
<b>Miridae family</b>			
<i>Deraeocoris ruber</i>	2n = 34 (30+2m+XY)	X and Y	[28]
<i>D. rutilus</i>	2n = 34 (30+2m+XY)	X	[28]
<i>Megaloceroea recticornis</i>	2n = 32 (30+XY)	X and Y	[28]
<b>Cimicidae family</b>			
<i>Cimex lectularius</i>	2n = 29 (26+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	X <sub>1</sub> and Y	[46]
<b>Tingidae family</b>			
<i>Agramma femorale</i>	2n = 12+XY	S	[36]
<i>Elasmotropis testacea</i>	2n = 14 (12+XY)	A	[36]
<i>Tingis cardui</i>	2n = 14 (12+XY)	A	[36]
<i>T. crispata</i>	2n = 14 (12+XY)	X and Y	[36]
<b>Reduvidae family</b>			
<i>Microtomus lunifer</i>	2n = 31 (28+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[47]
<i>Rhodnius prolixus</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>R. domesticus</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[22]
<i>R. pallescens</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[48]
<i>R. nasutus</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[23]
<i>R. neglectus</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. neivai</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. milesi</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. robustus</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[23]
<i>R. ecuadoriensis</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. pictipes</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. stali</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[23]
<i>R. colombiensis</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>Psammolestes tertius</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[22]
<i>Dipetalogaster maxima</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>Eratyrus cuspidatus</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	X <sub>1</sub> and Y	[22]
<i>Panstrongylus megistus</i>	2n = 21 (18+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>P. lignarius</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>P. chinai</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]

<i>Mepraia spinolai</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	S	[22]
<i>M. gajardoi</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	S	[22]
<i>Triatoma dimidiata</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. pallidipennis</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. phyllosoma</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. mazzottii</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. flavida</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. nitida</i>	2n = 21 (18+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. protracta</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. lecticularia</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[22]
<i>T. carrioni</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>T. boliviana</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>T. carcavalloii</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[22, 23]
<i>T. rubrovaria</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[49]
<i>T. sherlocki</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[22]
<i>T. brasiliensis</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[49]
<i>T. matogrossensis</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[49]
<i>T. vanda</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[22]
<i>T. garciabesi</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>T. maculata</i>	2n = 22 (20+XY)	X and Y	[22, 23]
<i>T. pseudomaculata</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[22, 23]
<i>T. wygodzinskyi</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[22, 23]
<i>T. delpontei</i>	2n = 22 (20+XY)	A, X	[22]
<i>T. platensis</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>T. infestans</i> (Andean group)	2n = 22 (20+XY)	A	[22]
<i>T. infestans</i> (Non-Andean group)	2n = 22 (20+XY)	X	[22]
<i>T. infestans melanosoma</i>	2n = 22 (20+XY)	X	[49]
<i>T. tibiamaculata</i>	2n = 23 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y)	A	[22]
<i>T. vitticeps</i>	2n = 24 (20+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y)	X <sub>3</sub> and Y	[22]
<i>T. pintodiasi</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[23]
<i>T. circummaculata</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[23]
<i>T. klugi</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[23]
<i>T. baratai</i>	2n = 22 (20+XY)	A	[23]

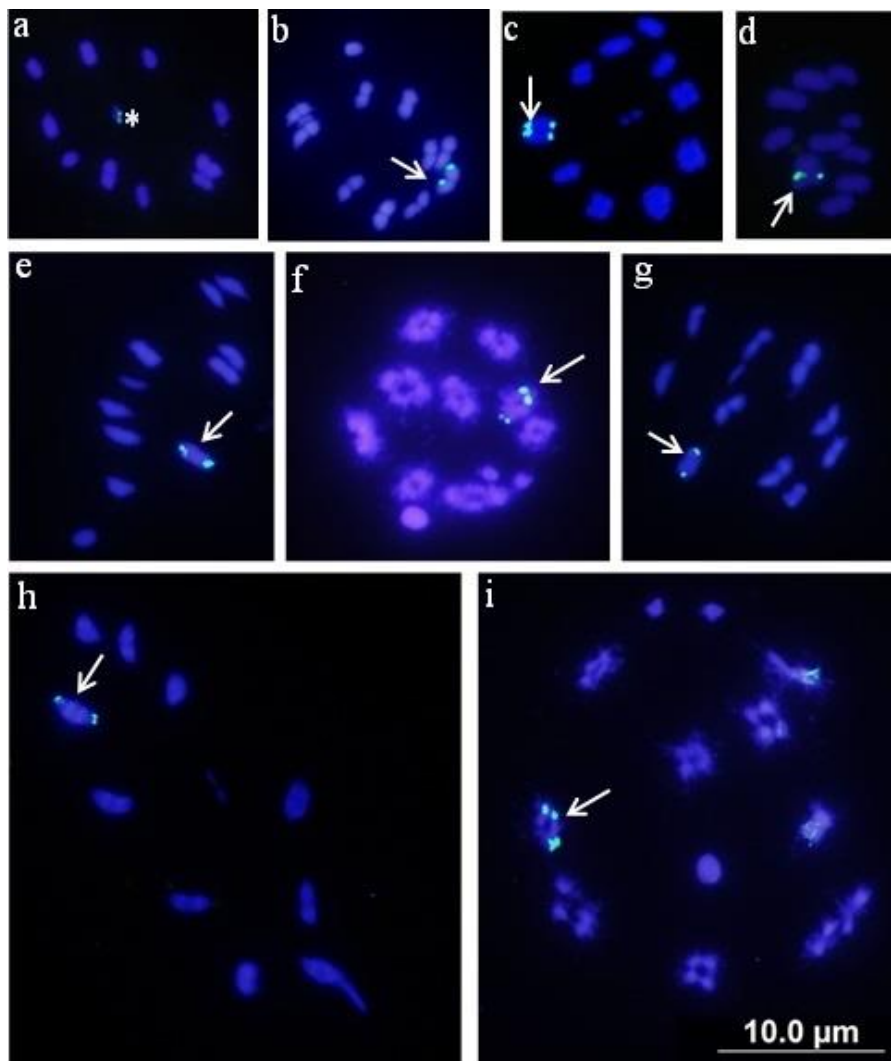
<i>T. costalimai</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[23]
<i>T. guazu</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[23]
<i>T. jatai</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[23]
<i>T. williami</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[23]
<i>T. jurbergi</i>	$2n = 22 (20+XY)$	X and Y	[23]
<i>T. sordida</i>	$2n = 22 (20+XY)$	X	[22]
<i>T. sordida Argentina</i>	$2n = 22 (20+XY)$	X and Y	[22]
<i>T. sordida La Paz</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[50]
<i>T. guasayana</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[50]
<i>T. patagonica</i>	$2n = 22 (20+XY)$	A	[23]

---

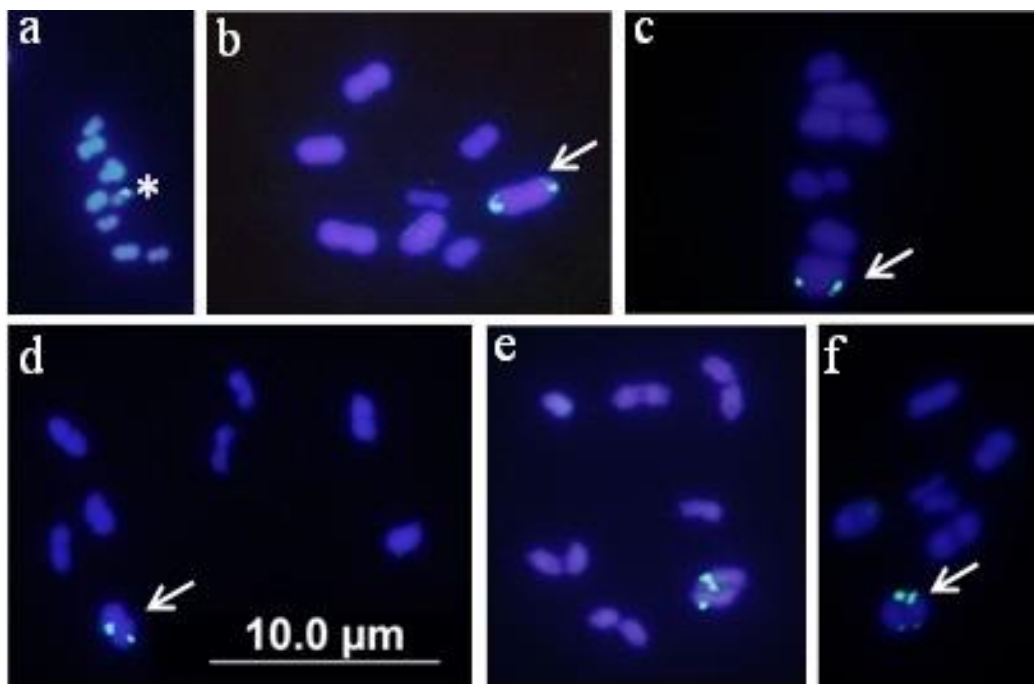


## Figures

**Fig. 1** Fluorescent in situ hybridization using the 18S probe in species of the family Coreidae. a) *Acantocephala parensis*, b) *Corecoris fuscus*, c) *Phitia picta*, d) *Leptoglossus zonatus*, e) *Lucullia flavovittata*, f) *Dalacoris pictus*, g) *Anasa Bellator*, h) *Corecoris batatas* and i) *D. obscura*. Asterisk: marking on the m-chromosome; Arrow: terminal marking on the autosomes. Bar: 10  $\mu$ m.



**Fig. 2** Fluorescent in situ hybridization using the 18S probe in species of the families Pentatomidae and Scutelleridae. a) *Odmalea* sp., b) *Mormidae* *v-luteum*, c) *Edessa colaris*, d) *Loxa virescens*, e) *Thyanta perditor* and f) *Pachycoris torridus*. Asterisk: marking on the m-chromosome; Arrow: terminal marking on the autosomes. Bar: 10  $\mu$ m.



# *Conclusões*

---

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

Com base no principal objetivo dessa tese, o de investigar os processos envolvidos na evolução da localização do DNAr 45S dos Heteroptera, 15 espécies foram analisadas com a técnica de FISH e os resultados foram comparados com mais 119 espécies estudadas com o mesmo marcador, permitindo, dessa forma, inferir um cenário evolutivo para as infraordens Pentatomomorpha, Nepomorpha e Cimicomorpha:

- Agmatoploidia/simploidia foram os principais eventos que levaram à variação numérica no cariótipo dos Coreidae;
- Sítios de DNAr em Coreidae localizados, principalmente, nos autossomos;
- Ausência de registro de DNAr 45S em cromossomos sexuais de Coreidae;
- Detecção do gene 45S em m-cromossomos de Coreidae, relacionando-o com atividade transcricional envolvida na biossíntese ribossomal;
- Proposta de origem autossômica dos m-cromossomos, pois a presença de DNAr 45S em m-cromossomos de *A. parensis* e *L. gonagra*, quando associada ao monofiletismo da família Coreidae, suporta essa hipótese, uma vez que todas as outras espécies de Coreidae apresentaram marcação em um par de autossomos;
- Conservação do cariótipo e do sistema de determinação do sexo XY/XX na família Pentatomidae (Pentatomomorpha);
- Sítios de DNAr em Pentatomidae, principalmente, nos autossomos, havendo poucos registros nos cromossomos sexuais;
- Proposta da ação de elementos de transposição atuando na diversificação do gene 45S em Pentatomidae;
- DNAr 45S na família Pyrrhocoridae (Pentatomomorpha) localizado em autossomos, cromossomo sexual X ou Neo X;
- Levantamento de duas possíveis hipóteses para a diversificação cromossômica do gênero *Dysdercus* (Pyrrhocoridae, Pentatomomorpha): i) evento de aneuploidia no cromossomo sexual Y (que resultou no sistema de determinação sexual XO) e ii) evento de

simploidia entre os cromossomos sexuais X e Y e o par de autossomos portador do gene 45S, seguido perda do locus ribossômico presente no cromossomo neo Y.

- Em geral, os sistemas de determinação do sexo observados na infraordem Pentatomomorpha foram XY/XX (predominante em Pentatomidae), XY/X0 (predominante em Coreidae) e Neo XY (presente na família Pyrrhocoridae) e os sítios de DNAr 45S foram distribuídos, preferencialmente, entre os autossomos;
- Eventos de agmatoploidia e simploidia levaram à alteração numérica durante a evolução cariotípica da família Belostomatidae (Nepomorpha) e elementos de transposição atuaram na reorganização genômica das espécies (que resultou em passagem do locus ribossômico dos autossomos para os cromossomos sexuais);
- Grande variabilidade na localização do gene 45S foi observada em Cimicomorpha, incluindo intraespecífica;
- Marcações restritas aos cromossomos sexuais nas famílias Miridae e Cimicidae (Cimicomorpha);
- DNAr 45S localizado nos autossomos e/ou cromossomos sexuais das famílias Tingidae e Reduviidae (Cimicomorpha);
- Eventos de recombinação ectópica e/ou elementos de transposição atuaram na grande variabilidade do gene ribossomal observada em Cimicomorpha;
- Em geral, o sistema cromossômico de determinação do sexo observado na infraordem Cimicomorpha foi do tipo simples (XY/XX) e múltiplos ( $X_1X_2Y$ /  $X_1X_2X_3Y$ ) e os sítios de DNAr 45S ocorreram principalmente nos cromossomos sexuais.

# *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. E.; FOLLY-RAMOS, E.; PETERSON, A. T.; LIMA-NEIVA, V.; GUMIEL, M.; DUARTE, R.; LIMA, M. M.; LOCKS, M.; BELTRÃO, M.; COSTA, J. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, p. 410–417, 2009.
- AVELAR, R. C.; QUINTILIANO, A. A.; FARIA, G.; DOURADO, D. C.; FRAGA, A. C.; CASTRO NETO, P. Avaliação da ocorrência do percevejo *Pachycoris torridus* em plantas de pinhão-manso do banco de germoplasma da UFLA. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2007.
- BARBOSA, N. C. C. P.; FREITAS, S.; MORALES, A. C. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and *COI* gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, 2014.
- BARDELLA, V. B.; FERNANDES, J. A. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, p. 1919-1925, 2016.
- 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.
- BUCK, R. C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 10, p. 393-400, 2010.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memoriais do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1 p. 159-218, 1909.

CHICKERING, A. M.; BACORN, B. Spermatogenesis in the Belatomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus*. **Papers of the Michigan Academy of Science, Arts, Letters**, v. 17, p. 529-534, 1933.

CHIRINO, M. G.; PAPERESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. The significance of cytogenetics for the study of karyotypes evolution and taxonomy of water bugs (Heteroptera, Belostomatidae) native to Argentina. **Comparative Cytogenetics**, v. 7, n. 2, p. 111-129, 2013.

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

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 373-383, 1998.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. **Genetics**, v. 175, n. 2, p. 477-485, 2007.

FROESCHNER, R. C. Family Scutelleridae Leach, 1815. The shield bugs, In: HENRY, T. J.; FROESCHNER R. C. (Eds.). **Catalog of the Heteroptera or true bugs, of Canada and the Continental United States**. New York: Brill, p. 684-693, 1988.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, p. 22-27, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ., p. 920, 2002.

GOLUB, N. V.; GOLUB, V. B. KUZNETSOVA, V. G. Variability of 18S rDNA loci in four lace bug species (Hemiptera, Tingidae) with the same chromosome number. **Comparative Cytogenetics**, v. 9, p. 513-522, 2015.



GONZALEZ-GARCIA, J. M.; ANTONIO, C.; SUJA, J. A.; RUFAS, J. S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 4, p. 124-132, 1996.

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 Neotropica**, vol. 11, 2011.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os Insetos: Um resumo de Entomologia**. Department of Entomology, University of California, Davis, USA, 2008.  
HENRY, T.J. Biodiversity of Heteroptera. *Insect biodiversity: science and society*, p. 223-263, 2009.

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

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, p. 212–218, 2014.

JACOBS, D.H. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae). **Chromosome Research**, v. 12, p. 175-191, 2004.

JANDE, S. S. Chromosome number and sex mechanism in twenty seven species of Indian Heteroptera // Res. Bull. (Panjab Univ.), v. 10, p. 215-217, 1959.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123520, 1979.

Li, X. Z. Cladistic analysis and higher classification of coreoidea. **Entomologia Sinica**, V. 3, p. 283-292, 1996.

MAHNERM. Systema Cryptoceratorum Phylogeneticum (Insecta, Heteroptera). **Zoologica**, v. 48, p. 1–302, 1993.

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

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.

MAZZUCCONI, S. A.; LÓPEZ-RUF, M.; BACHMANN, A.O. Gerromorpha y Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) del Parque Provincial Salto Encantado del Valle del Cuñá Pirú, Provincia de Misiones, Argentina. **Lundiana**, v. 9, p. 57-66, 2009.

MOTZKO, D.; RUTHMANN, A. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 33, p. 205-216, 1984.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.

NIESER, N. The water bugs (Heteroptera: Nepomorpha) of the Guyana Region. Studies on the Fauna of Suriname and other Guyanas, v. 16, n. 59, p. 1–310, 1975.

NIESER, N.; MELO, A. L. Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais. Guia introdutório com chave de identificação para as espécies de Nepomorpha e Gerromorpha. Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, p. 180, 1997.

PANIZZI, R. A.; McPHERSON, J. E.; JAMES, D.G.; JAVAHERY, M. McPHERSON, R. M. Stink bugs (Pentatomidae). In Heteroptera of economic importance (C.W. Schaefer; A.R. Panizzi, eds.). **CRC Press**, Boca Raton, p.421-474, 2000.

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

PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M.J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of Biology Research**, v. 5, p. 3-21, 2006.

PEREDO, L. C. Description, biology, and maternal care of *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae). **Florida Entomologist**, v. 85, p. 464-473, 2002.

PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 8, p. 2934-2938, 1986.

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

RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosoma italicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.

SANCHEZ-SOTO, S.; MILANO, P.; NAKANO, O. Nova planta hospedeira e novos padrões cromáticos de *Pachycoris torridus* (Scopoli) (Hemiptera: Scutelleridae) no Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 109-111, 2004.

SANTOS, J. C.; SILVEIRA, F. A. O.; ALMEIDA, F. V. M.; FERNANDES, G. W. Ecology and behavior of *Pachycoris torridus* (Hemiptera: Scutelleridae): new host plant, color polymorphism, maternal care and parasitism. **Lundiana**, v. 6, p. 107-111, 2005.

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

SCHERBAKOV, D. E., POPOV, Y. A. Superorder Cimicidea Laicharting, 1781. Order Hemiptera Linne, 1758. The bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. In *History of Insects*, ed. AP Rasnitsyn, DLJ Quicke, pp. 143–57. Dordrecht, The Nether.: Kluwer Academic, p. 517, 2002.

SCHRADER, F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. **Cytologia** (Toldo), v. 6, p. 422-430, 1935.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **Journal Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press Ithaca, New York, v. 12, p. 336, 1995.

SCHUH, R.T.; WEIRAUCH, C.; HENRY, T.J.; HALBERT, S.E. Curaliidae, a new family of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) from the Eastern United States. **Annual Entomology Society of America**. V. 101, p. 20–29, 2008.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. Quarto catalogados insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores. Parte 2 Tomo 1º, insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, p. 622, 1968.

SOUZA-FIRMINO, T. S.; ALEVI, K. C. C. ; PEREIRA, L. L. V. ; BANHO, C. A. ; SILVA JUNIOR, F. C. ; SILISTINO-SOUZA, E. R. ; ITOYAMA, M.M. . Checklist and description of three new chromatic patterns of *Pachycoris torridus* (Scopoli, 1772) (Hemiptera: Scutelleridae). **Biota Neotropica** v. 16, p. 1-5, 2016.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). **Revista Unorp**, São José do Rio Preto. v. 4, n. 11, p. 115-131, 2006.

UESHIMA, N. Hemiptera II: Heteroptera. – In: Bernard, J. (ed.), Animal cytogenetics. **Insecta**. Berlin-Stuttgart, v. 3, 1979.

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

USINGER, R. L. Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera). College Park, Md., Entomological Society of America, p. 585, 1966.

WHEELER, W. C.; SCHUH, R.T.; BANG, R. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. **Entomologica Scandinavica**, v. 2, p. 121-137, 1993.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annual Review of Entomology**, 56, 487–510, 2011.

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

XIE, Q.; TIAN, Y.; ZHENG, L.; BU, W. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera) **Molecular Phylogenetics and Evolution** p. 463–471, 2008.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p. 203-214, 2000.