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

Hederson Vinícius de Souza

Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S

São José do Rio Preto, SP
2013

Hederson Vinícius de Souza

Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S

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

Orientador: Profª. Drª. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto, SP
2013

Souza, Hederson Vinícius de
Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S / Hederson Vinícius de Souza. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.
128 f. : il. ; 30 cm.

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

1. Heteroptera. 2. Coreidae. 3. Pentatomidae. 4. Evolução. 5. Gene COI. 6. Gene 16S. 7. Gene 18S. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.754

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

Hederson Vinícius de Souza

Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S

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

Banca Examinadora

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

Profª. Drª. Maria Izabel Camargo Mathias
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba-MG

Profª. Drª. Eliana Morielle Versute
UNESP – São José do Rio Preto

Profª. Drª. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP
22 de fevereiro de 2013

"Aos meus pais Helio e Ana e às minhas irmãs pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões"

AGRADECIMENTOS

Esta tese teve participação especial de muitas pessoas, que deixaram suas marcas entre as linhas desse trabalho.

No início foi muito difícil, entrei em um mundo novo, o da molecular, mas encontrei pessoas amáveis e gentis que me apoiaram e ensinaram-me, como a Profª. Drª. Eliana Morielle Versute, que disponibilizou seu espaço e materiais e a Profª. Drª. Sandra Regina de Carvalho Marchesin que me auxiliou e ainda auxilia muito com sua "expertise".

Meus amigos de trabalho, MSc. Márcia Maria Urbanin Castanhole, MSc. Mariana Gomes de Oliveira e MSc. Luis Lenin Vicente Pereira, que me ajudaram e acompanharam meus passos durante essa escalada, deixando esse trabalho ainda mais prazeroso.

Agradeço, também, às Professoras Drª. Jocélia Grazia e Drª. Aline Barcellos pela identificação dos especimes deste trabalho e aos Professores Drª. Claudia Marcia Aparecida Carareto e Dr. Fernando Barbosa Noll que abrilhantaram esse trabalho com maravilhosas sugestões. Aos Professores Drª. Maria Izabel Camargo Mathias, Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego, Drª. Eliana Morielle Versute e Drª. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo pelas sugestões e críticas durante a defesa da presente tese.

Em especial, agradeço a Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, minha orientadora, que desde o estágio básico tem me ensinado, incentivado e motivado para que eu possa sempre fazer o melhor.

Aos funcionários deste Instituto, em especial, aos da seção de Pós-Graduação, cujo companheirismo, atenção e presteza são insuperáveis.

Aos órgãos de fomento, CNPq, pela bolsa concedida nos anos iniciais desse doutorado e a FUNDUNESP pelo auxílio com as despesas do projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos que me auxiliaram na elaboração desta tese.

"Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho".

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os Heteroptera apresentam particularidades, como a variação entre as espécies no número de lobos testiculares e colorações diferentes da bainha peritoneal. Além destas características, algumas espécies da família Pentatomidae possuem um dos lobos testiculares com características morfológicas e celulares diferentes dos demais lobos, levando à formação de espermatozoides com funções diversificadas. Embora apresentem inúmeras características peculiares, como as tratadas anteriormente, o modo como evoluem necessita de análises aprofundadas. Assim, o presente trabalho objetivou analisar a evolução dos caracteres números de lobos, pigmentação da bainha peritoneal, espermatozoides não fertilizantes e cariótipo, baseando-se nas reconstruções filogenéticas. Foram utilizados, como marcadores, moleculares os genes mitocondriais *COI*, 16S e o nuclear 18S. Foi feito o sequenciamento de parte desses genes de 25 espécies de Heteroptera, sendo 12 da Família Coreidae e 13 da família Pentatomidae. Verificou-se que sozinhos estes genes não forneceram uma inferência segura nas análises evolutivas. Com tais genes concatenados, as informações puderam se somar, porém devido à baixa consistência nos ramos, as inferências evolutivas devem ser vistas com cautela. Desse modo, esta pesquisa evidenciou a complexidade das distribuições das características testiculares e citogenéticas relatadas através da filogenia molecular. Tornando-se necessário ampliar estes estudos com novas abordagens, como a utilização de caracteres morfológicos ou outros marcadores moleculares para elucidar sua evolução.

Palavras-chave: Heteroptera. Coreidae. Pentatomidae. Filogenética. Gene *COI*. Gene 16S. Gene 18S.

ABSTRACT

Heteroptera have peculiarities, including varying numbers of testicular lobes and different coloration of the peritoneal sheath between species. In addition to these features, some species in the Pentatomidae family have testicular lobes with morphologies and cells that are differentiated from the others, leading to the formation of spermatozoa with diversified functions. Although Heteroptera have many peculiar features, such as those previously reported, the study of their evolution requires detailed analysis. Thus, this study aimed to analyze the evolution of the characteristic number of lobes, peritoneal sheath pigmentation, production of non-fertilizing sperm and karyotype based on phylogenetic reconstructions using molecular markers, such as the COI, 16S and nuclear 18S mitochondrial genes. Thus, portions of genes from 25 Heteroptera species, including 12 from the Coreidae family and 13 from the Pentatomidae family, were sequenced. These genes alone did not provide reliable inference for evolutionary analyzes. With such concatenated genes, information could be added, but due to low consistency in the branches, the resulting evolutionary inferences must be viewed with caution. Thus, this research demonstrated the complexity of the distributions of the testicular and cytogenetic characteristics inferred by molecular phylogeny, and it is necessary to extend these studies with new approaches, such as the use of morphological or other molecular markers to elucidate evolution.

Keywords: Heteroptera. Coreidae. Pentatomidae. Phylogenetics. COI gene. 16S. Gene 18S.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 01

1- Dados Gerais dos Heteroptera 01

2- Família Coreidae 04

3- Família Pentatomidae 06

4- Dados Moleculares 08

5- Os Genes *COI*, 16S e 18S 10

II. OBJETIVOS 14

III. CAPÍTULO 1

Analysis of the mitochondrial *COI* gene and its informative potential for evolutionary inferences in the Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) families **15**

IV. CAPÍTULO 2

Análise dos genes 16S e 18S e seus potenciais informativos para inferências evolutivas nas famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) **39**

V. CAPÍTULO 3

Análise evolutiva dos lobos testiculares e aspectos citogenéticos baseada nos genes *COI*, 16S e 18S da família Coreidae (Heteroptera) **56**

VI. CAPÍTULO 4

Análise evolutiva dos lobos testiculares e aspectos citogenéticos baseada nos genes *COI*, 16S e 18S da família Pentatomidae (Heteroptera) **73**

VII. CAPÍTULO 5

Análise *in silico* do potencial informativo para inferências evolutivas dos genes mitocondriais codificantes de proteínas de 42 espécies da ordem Hemiptera **94**

VIII. DISCUSSÃO GERAL 115

IX. CONCLUSÃO 120

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121

I. INTRODUÇÃO

1- Dados Gerais dos Heteroptera

Os Heteroptera ou percevejos verdadeiros constituem um dos mais importantes grupos de insetos do ponto de vista econômico, pois a maioria, durante os estádios de ninfa e adulto, alimenta-se de plantações ou grãos armazenados para o consumo humano. Os Heteroptera incluem aproximadamente 37.000 espécies distribuídas em oito infraordens, cinco das quais abrigam essas espécies nocivas (REBAGLIATI et al., 2005).

Essa ordem é constituída de 79 famílias, sendo a Pentatomidae uma das maiores. Possuem grande diversidade de habitats (parasitas de pássaros, morcegos, vivem em teias de aranhas, na água ou na sua superfície), podem ser fitófagos (produzindo grandes prejuízos à produção de grãos), predadores (trazendo grandes benefícios, pois consomem insetos destrutivos) ou hematófagos (vetores da doença de Chagas aos humanos e da raiva aos morcegos) (SCHUH; SLATER, 1995). A maioria ocorre em todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas, sendo que as famílias comumente encontradas na região de São José do Rio Preto-SP (20º 47’ 13” S, 49º 21’ 38 W), Brasil, são Belostomatidae, Coreidae, Gelastocoridae, Gerridae, Lygaeidae, Notonectidae, Pentatomidae, Phyrrocoridae, Reduviidae, Rhopalidae e Veliidae.

Algumas características tornam os Heteroptera peculiares, como a presença de cromossomos holocêntricos (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996), atividade cinética restrita aos finais dos cromossomos, ou seja, nas regiões teloméricas (cromossomos são denominados telocinéticos, GONZALEZ-GARCIA et al., 1996; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; MOTZKO; RUTHMANN, 1984; SCHRADER, 1940). Presume-se que ocorra terminalização dos quiasmas (JOHN; KING, 1985), embora haja trabalhos que discutam este assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987), e sabe-se que a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os sexuais.

Os sistemas cromossômicos do sexo descritos em Heteroptera são caracterizados como: simples XY/XX (74,7% das espécies) e X0/XX (14,8%) ou

múltiplos (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente, do Y, Xn0/XnXn, XnY/XnXn e XYn/XX, 10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984). Há, ainda, um sistema particular neo-XY (CHICKERING; BACORN, 1933; SCHRADER, 1940; JANDE, 1959). Dentro de Heteroptera, podemos encontrar famílias com sistema X0 prevalecendo na maioria das espécies integrantes, como em Coreidae (SOUZA et al., 2007a) ou com prevalência de XY, como em Pentatomidae (REBAGLIATTI et al., 2005).

Outra particularidade dos Heteroptera é a presença de m-cromossomos que diferem dos demais por não parear durante a prófase meiótica, sofrer pareamento *touch-and-go* na primeira divisão meiótica e segregar-se na primeira divisão meiótica (NOKKALA; NOKKALA, 1983). Eles foram primeiramente descritos na família Coreidae (Heteroptera), por Paulmier (1899), na qual a presença desses m-cromossomos é característica dessa família. Subsequentemente foram encontrados em outras espécies das famílias Nepomorpha, Leptopodomorpha e Pentatomomorpha (incluindo Lygaeidae, UESHIMA, 1979; GROZEVA, 1995). A presença de um par de m-cromossomos foi relatada em 16 famílias, pertencentes a quatro infraordens (UESHIMA, 1979; NOKKALA; NOKKALA, 1986).

Uma característica ainda pouco explorada em Heteroptera é a pigmentação da bainha peritoneal que reveste os lobos testiculares (Figura 1). Há descrição, na literatura, de bainha peritoneal avermelhada, como por exemplo, em espécies das famílias Alydidae (SOUZA et al., 2009), Coreidae (SOUZA et al., 2007a, 2009), Lygaeidae (SOUZA et al., 2007b), Pentatomidae (SOUZA et al., 2007c, 2008a) e Rhopalidae (SOUZA et al., 2009), e amarelada ou translúcida como em outras espécies das famílias Coreidae (SOUZA et al., 2007b) e Gerridae (CASTANHOLE et al., 2008). Podem, ainda, observar testículos com duas bainhas de mesma cor (amarelada) ou de cores diferentes (externa, amarelada e interna avermelhada), como as observadas em espécies da família Pentatomidae (SOUZA et al., 2011). Essa diversidade de pigmentação, aparentemente, não apresenta um padrão que possa ser relacionado a algum agrupamento, como Família, por exemplo, exceto para os Heteroptera aquáticos analisados até o momento, que apresentam bainha translúcida (CASTANHOLE et al., 2008).

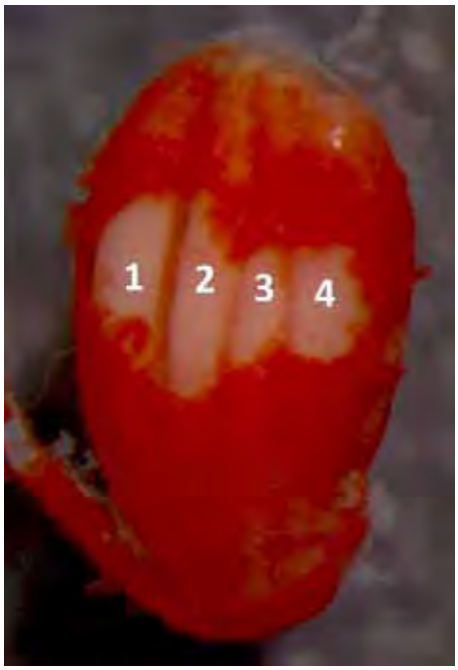

Figura 1. Testículo da espécie *Oebalus poecilus* (Pentatomidae) evidenciando a bainha peritoneal avermelhada cuja parte mediana foi removida, expondo quatro lobos testiculares (numerados de 1 a 4). Foto do autor.

A bainha peritoneal envolve e protege os testículos, os quais, em Heteroptera, são formados por número variável de lobos testiculares, tendo sido descritos sete em espécies das famílias Alydidae (SOUZA et al., 2009), Coreidae (SOUZA et al. 2007c; 2009), Pentatomidae (SOUZA et al., 2011) e Rhopalidae (SOUZA et al., 2009); seis em espécies da família Pentatomidae (SOUZA et al., 2007c, 2011, SOUZA; ITOYAMA, 2010), cinco na família Alydidae (SOUZA et al., 2009), quatro na família Pentatomidae (SOUZA et al., 2008a, 2011) e Coreidae (SOUZA et al., 2007a), três na família Pentatomidae (SOUZA et al., 2008a, 2011) ou dois em Gerridae (CASTANHOLE et al., 2008, 2010). Embora os Heteroptera apresentem uma variabilidade grande com relação ao número de lobos, ainda não há estudos que enfoquem a evolução dessa característica.

Algumas dessas características são típicas de determinadas famílias de Heteroptera, como em Coreidae que apresenta variabilidade cariotípica maior entre as espécies, sistema cromossômico do sexo X0, presença de m-cromossomos, entre outros (SOUZA et al., 2007a). A característica mais notória em Pentatomidae é a presença de espermatozoides não fertilizantes em alguns lobos testiculares de algumas espécies (SOUZA; ITOYAMA et al., 2010).

Em geral, tais características, dispersas na literatura, carecem de estudos a fim de tentar estabelecer um possível cenário evolutivo.

2. Família Coreidae

A família Coreidae (Heteroptera), cujos representantes também são conhecidos como "leaf-footed", é a família com maior número de espécies dentro do grupo, aproximadamente 1800 (SCHUH; SLATER, 1995). Os Coreidae são amplamente distribuídos, embora sejam mais abundantes em regiões tropicais e subtropicais e, nestas áreas, atingem os maiores tamanhos. A maioria deles possui aparência exótica e um número significativo tem importância econômica (SCHUH; SLATER,1995) (Figura 2a). Os coreídeos são, de modo geral, essencialmente fitófagos, sendo que alguns trabalhos reportam coprofagia e alimentação em carcaças (MITCHELL, 2000). São em geral considerados pragas de importância econômica. Algumas espécies como *Anasa* spp. (Coreidae), em Cucurbitaceae (MITCHELL, 2000) e *Phthia picta* (Drury) (Coreidae), em Solanaceae (MITCHELL, 2000) têm sido reportadas como pragas importantes no Brasil (PANIZZI et al., 2000) e, mais recentemente, como vetores de patógenos de plantas (MITCHELL, 2004).

Com relação às características citogenéticas, o sistema cromossômico do sexo prevalente em Coreidae é X0/XX (macho/fêmea). Esse grupo apresenta uma característica distinta da maioria das espécies que é a presença de um par de m-cromossomos, os quais se associam em um pseudobivalente no centro da placa metafásica I e sofrem divisão pré-reducional (WILSON, 1905; BRESSA et al., 2001) (Figura 2a,b).

O número diploide de cromossomos varia de 13 (10A + 2m + X0) a 28 (24A + 2m + X_1X_20), sendo que a maioria apresenta 21 cromossomos (UESHIMA, 1979; SANDS, 1982; MANNA, 1984; COLOMBO; BIDAU, 1985; DEY; WANGDI, 1988; SATAPATHY; PATNAIK, 1989; CATTANI; PAPESCHI, 2004, SOUZA et al., 2007a) (Figura 2a,b).

A literatura sugere que os complementos cromossômicos constituídos de um alto número de cromossomos são originados pela duplicação ou fragmentação de um par de autossomos (UESHIMA; ASHLOCK, 1980). De acordo com Jacobs

(2004), como todos os Heteroptera apresentam 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 fragmentação pode, portanto, levar facilmente ao aumento do número cromossômico. Da mesma maneira, fusão cromossômica é, também, teoricamente mais fácil em organismos com cromossomos holocêntricos, pois não ocorrem problemas associados com a formação de cromossomos dicêntricos. Assim, a diversidade no número de cromossomos em Heteroptera, em especial da família Coreidae, permanece inexplicada, precisando de mais análises para compreensão desses processos de variabilidade no número de cromossomos entre as espécies.

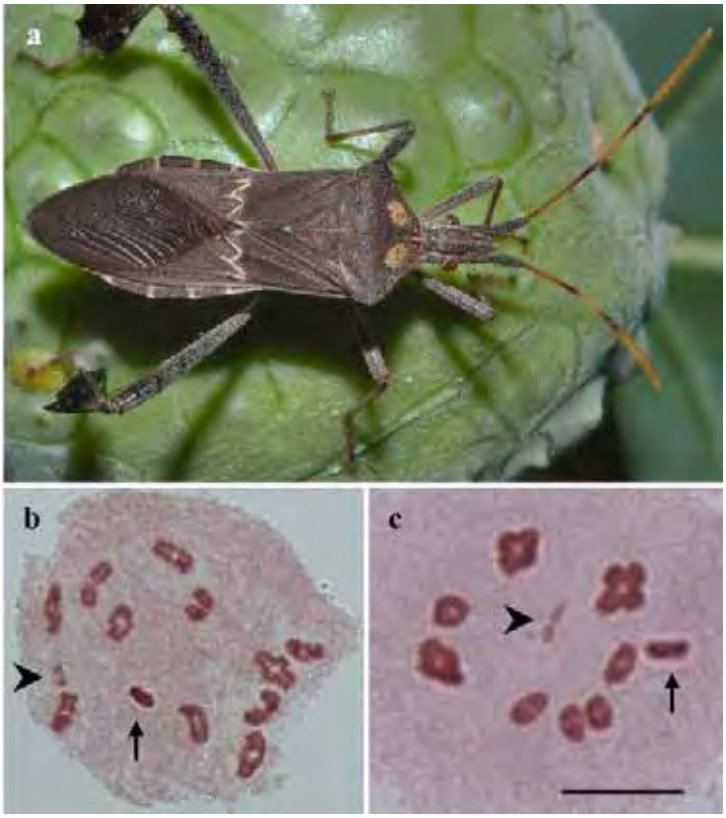

Figura 2. a) Imagem da espécie *Leptoglossus zonatus* (Coreidae) (disponível em <http://www.asergeev.com/pictures/archives/compress/2008/679/jpeg/20t.jpg>); b) prófase meiótica: diacinese da espécie *Anisoscelis foliacea* mostrando um cariótipo de 2n= 27 (24A + 2m + X0); c) metáfase de *Hypselonotus fulvus* evidenciando um cariótipo de 2n= 19 (16A + 2m + X0), sendo os autossomos dispostos em círculo com o par de m-cromossomos ao centro (cabeça de seta) e o cromossomo sexual (seta) localizado fora do círculo. Barra= 10 µm.

3. Família Pentatomidae

A família Pentatomidae é, em número de espécies, uma das maiores nos Heteroptera, sendo cosmopolita e com maior diversidade nos trópicos. Conta com aproximadamente 760 gêneros e 4.112 espécies (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Esses insetos são conhecidos como Marias-fedidas devido à produção de um odor desagradável emitido pelos ductos das glândulas produtoras de cheiro, que se abrem na região do metapleura. Schuh e Slater (1995) incluíram oito subfamílias nesta família: Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae (Figura 3a - Pentatominae). Os fitófagos economicamente mais importantes são espécies pertencentes às subfamílias Edessinae e Pentatominae e englobam a maioria das espécies que são pragas de grãos. As espécies pertencentes à Asopinae são predadoras, e algumas dessas são importantes agentes de controle biológicos (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Relatos citogenéticos de espécies da família Pentatomidae mostram número diploide de cromossomos, em machos, de seis a 27, sendo 14 o mais frequente (85%) (REBAGLIATI et al., 2005), e sistema cromossômico do sexo XX/XY (fêmea/macho), exceto em três espécies (*Macropygium retuculare*, X_1X_2Y; *Rhytidolomia senilis*, neo-XY e *Thyanta calceata*, X_1X_2Y). Não apresentam m-cromossomos (Figura 3c). Entretanto, uma característica particular dos Pentatomidae é a ocorrência, em algumas espécies, de uma meiose atípica em um dos lobos testiculares denominado lobo *harlequin* (LANZONE et al., 2003; REBAGLIATI et al., 2001; REBAGLIATI et al., 2005). As subfamílias que geralmente apresentam este lobo são a Edessinae, a Pentatominae e a Discocephalinae (REBAGLIATTI et al., 2005). Segundo Schrader (1945a,b, 1946a,b), o lobo *harlequin* não possui ocorrência acidental ou esporádica nas espécies possuidoras. Eles são encontrados em todos os testículos e em todos os machos de uma dada espécie e é sempre o mesmo lobo. Em Discocephalinae, por exemplo, geralmente o lobo 5 é *harlequin*, contado a partir do ducto ejaculatório (Figura 3b).

Souza e Itoyama (2010) realizaram uma revisão bibliográfica com relação à variação dos números de lobos testiculares e características celulares de cada

lobo e verificaram que três é o número mínimo de lobos necessários para a fertilização e, quando há mais lobos, estes podem apresentar células com funções não fertilizantes. Este trabalho, também demonstrou que as diferenças celulares entre os lobos variam entre os grupos analisados da família Pentatomidae, mas os passos evolutivos para a formação de lobos não fertilizantes ainda é de conhecimento incerto.

Segundo Rebagliati et al. (2005), as características que são diferentes no lobo *harlequin*, comparado aos demais, são as associações não específicas dos autossomos, disposição anômala dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e fusão celular, resultando a produção de espermatozoides com número cromossômico altamente variável, o qual pode afetar a fertilidade do indivíduo. Até a revisão de Rebagliati et al. (2005) foram identificadas 22 espécies, pertencentes a 15 gêneros e três subfamílias diferentes (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) possuidoras deste lobo (Figura 3d-g).

Outros lobos podem, também, estar associados com a formação de espermatozoides não fertilizantes, como por exemplo, em *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae), cujos lobos 4 e 6 apresentam células polimégalas, isto é, grandes em tamanho e com poliploidia, além de diferenças metabólicas intralobulares significativas (SOUZA et al., 2007c, 2008b) (Figura 3h-j).

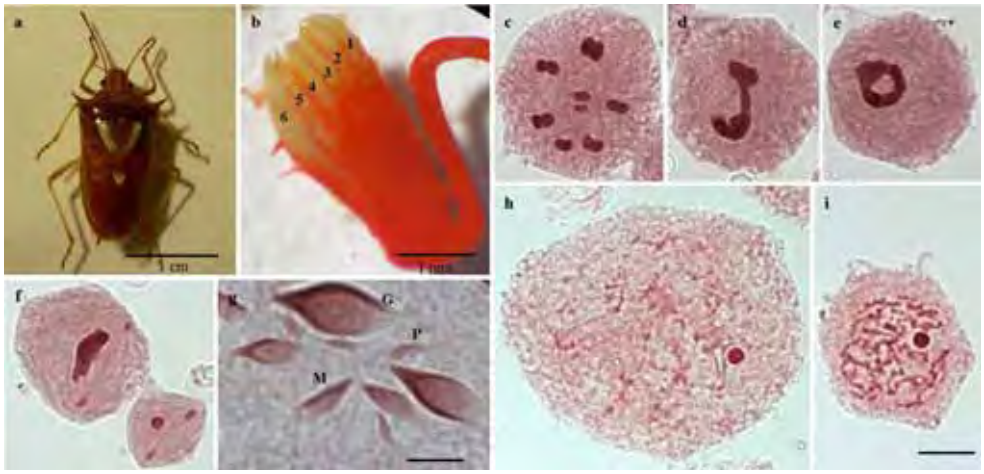

Figura 3. a) *Oebalus ypsilongriseus* (Heteroptera: Pentatomidae); b) testículo de *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae) constituídos de seis lobos testiculares e envolvidos por uma bainha peritoneal avermelhada; c-g) células meiótica de *A. tripterus* mostrando metáfase com seis pares de autossomos dispostos em círculos e os cromossomos sexuais XY ao centro (c); disposição anômala dos cromossomos na metáfase do lobo *harlequin* (d, e); distribuição desigual da cromatina durante a anáfase (f); formação de espermatozoides de diferentes tamanhos no lobo *harlequin* (g); h,i) células dos testículos de *Euschistus heros* evidenciando uma célula polimégala (h) e uma célula típica (i). As imagens (f) e (g) foram obtidas por Souza et al. (2007c). As demais imagens foram obtidas pelo autor. Barra= 10 µm.

Estudos realizados por Souza et al. (2010) suportam que, quando há formação de células diferenciadas, estas estão relacionadas aos lobos de 4 a 6. Tal fato pode sugerir uma pré-adaptação para formação de espermatozoides não fertilizantes nesses lobos. Contudo, com os resultados disponíveis até o momento, não é possível caracterizar um padrão de distribuição evolutiva dos espermatozoides não fertilizantes entre as Subfamílias ou Tribos.

4- Dados Moleculares

A crescente disponibilidade de sequências de DNA em bancos de dados públicos e os avanços da Bioinformática vêm permitindo o desenvolvimento de novas abordagens e estratégias para a análise de sequências através da genômica comparativa, que enfoca o estudo das diferenças e similaridades na estrutura e organização dos genomas em diferentes organismos (PRIMROSE; TWYMAN, 2003). A análise comparativa de sequências de nucleotídeos está se mostrando cada vez mais importante como uma ferramenta para identificar regiões reguladoras no DNA, compreender os mecanismos e história da evolução molecular, e deduzir as similaridades e diferenças na organização gênica entre espécies de interesse (SCHWARTZ et al., 2000).

Comparando sequências de DNA genômico de diversas espécies, elementos funcionais podem ser reconhecidos com base na sua conservação evolutiva, já que importantes sequências biológicas são conservadas entre espécies devido a restrições funcionais e, portanto, tendem a evoluir a uma taxa menor que as sequências não funcionais (BATZOGLOU et al., 2000; BLANCHETTE et al., 2002; LUDWIG, 2002; FRAZER et al., 2003; NOBREGA; PENNACHIO, 2004). Os genes ortólogos são as sequências mais comparadas nessas análises e definem a base dos estudos de evolução molecular, pois, ao contrário de pseudogenes, genes ortólogos sofrem pressão seletiva que retém seus sítios de ligações funcionais (LENHARD et al., 2003). Ortólogos referem-se a genes homólogos entre diferentes genomas que derivam de um mesmo gene presente na última espécie ancestral em comum (KOONIN et al., 1996; FRAZER et al., 2003).

A partir da década de 80, diferentes tipos de DNA (mtDNA,

principalmente) vêm sendo amplamente utilizados em estudos genéticos e evolutivos. Pesquisas em nível molecular têm dado muita ênfase aos estudos sistemáticos, em vários grupos de animais. O genoma mitocondrial, pelas suas características e particularidades, tem sido especialmente útil em estudos de análises evolutivas dos organismos.

O DNA mitocondrial animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica, aproximadamente, 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. O conteúdo em termos de genes é extremamente conservado, contudo, algumas diferenças são relatadas quando comparados organismos que divergiram há muito tempo, como entre ordens e classes taxonômicas (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Outra característica que torna a molécula de DNA mitocondrial muito atrativa para estudos populacionais e evolutivos é o fato dela ser citoplasmática, de modo que não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação. Uma terceira característica fundamental dessa molécula é a sua alta taxa de evolução: 10 vezes superior a um gene de cópia única nuclear (CORNELI; WARD, 2000; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais são frequentemente limitadas a espécies proximamente relacionadas, devido a sua alta taxa de substituição de nucleotídeos. Contudo, variações nos conteúdos gênicos mitocondriais e sua ordem têm sido utilizados para elucidar relações evolutivas entre espécies relacionadas e distantes evolutivamente, baseada em características compartilhadas e derivadas que retomam a um ancestral comum que originou o grupo (BOORE et al., 1998).

Sequências parciais de genes mitocondriais de várias espécies têm sido utilizadas como marcadores para análises filogenéticas. Por exemplo, o gene *COI* tem sido extensivamente utilizado para identificação de espécies nos projetos de "DNA barcoding" (RATASINGHAM; HEBERT, 2007; KRESS; ERICKSON, 2008). Em particular, em Hexapoda, projetos de "DNA barcoding" têm sido conduzidos para abranger múltiplas ordens (PFENNINGER et al., 2007; NELSON et al., 2007; STAHLS; SAVOLAINEN, 2008), resultando em, pelo menos, 50.000 sequências parciais do loco *COI* no NCBI.

5- Os Genes *COI*, 16S e 18S

Citocromo C oxidase (COX) é a enzima terminal da cadeia respiratória de muitas mitocôndrias, que catalisa a transferência de elétrons do citocromo C, reduzida, para a molécula de oxigênio. Ela é composta de 13 subunidades estruturais sendo três (I, II, e III) codificadas por genes mitocondriais (*COI, COII* e *COIII*) e 10 (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc e VIII) por genes nucleares. As subunidades codificadas por DNA mitocondrial formam o núcleo catalítico da enzima e são similares àqueles dos procariotos que necessitam de somente quatro subunidades para o funcionamento completo. Além destas subunidades estruturais, um grande número de outros fatores é necessário para reunir e manter o complexo IV holoenzimático ativo (GROSSMAN; LOMAX, 1997; SHOUBRIDGE, 2001; RICHTER; LUDWIG, 2003). O gene *COI* apresenta pouco mais que 1.500 pares de bases, por exemplo, *Triatoma dimidiata* possui 1.533 (DOTSON; BEARD, 2001), *Nezara viridula* 1.537 e *Hydaropsis longirostris* 1.534 (HUA et al., 2008).

Em genes rRNA o padrão de substituição tende a favorecer a transição das bases U ↔ C (MARSHALL, 1992). Esse viés é esperado e é causado principalmente pelo fato de que o nucleotídeo G pode emparelhar com U ou C sem afetar a estrutura secundária da molécula de rRNA (XIA et al., 2003). Esta facilidade de substituição é, em parte, a razão para o modelo Tamura e Nei (1993) que usa um parâmetro para a transição T ↔ C e outro para a transição A ↔ G (XIA et al., 2003).

O gene 16S codifica a subunidade menor do ribossomo e corresponde a uma região altamente conservada do genoma. Como os demais genes ribossomais são moléculas universais e a similaridade na sua estrutura sugere que tenham evoluído muito cedo em um ancestral comum a todos os seres vivos e se alterado relativamente pouco até hoje (WILMOTTE, 1994). Este gene apresenta um tamanho que varia de 1.237 a 1.513 pares de bases, tendo sido utilizado para inferir relações filogenéticas em diversos níveis taxonômicos de invertebrados (SIMON et al., 1994). Contudo, devido ao seu baixo nível de divergência, o gene 16S pode falhar ao analisar as relações taxonômicas entre espécies do mesmo gênero, mas este gene pode ser muito útil para relações taxonômicas de táxons mais distantes, como famílias (MURAJI et al., 2000). De fato, a análise de populações de *Triatoma* evidenciou diferenças de apenas 0,3 a

0,8% (SAINZ, 2004). Tais diferenças podem, contudo, ser suficientes e justificar a utilização deste gene como marcador de espécie, como sugere Ceretti Junior et al. (2008) no estudo com Triatomíneos.

A pequena subunidade nuclear ribosomal 18S (18S rDNA), além de ser útil para inferências em táxons menos inclusivos, por ser conservada, fornece sequências obtidas rapidamente e apresenta facilidade para se desenhar primers (KJER, 1995; WOESE, 1987). Alguns estudos têm utilizado com sucesso a sequência parcial ou completa desse gene para analisar relações evolutivas entre as linhagens mais inclusivas de Hemiptera (WHEELER et al., 1993; CAMPBELL et al., 1995; SORENSEN et al., 1995).

Ao analisar o gene 18S, há necessidade de saber se ele é cópia única no genoma. Esta questão é considerada crucial, porque os genes rRNA têm sido anunciados como referência universal na filogenia molecular (OLSEN; WOESE, 1993), e seria realmente frustrante se, muitas vezes, forem encontradas cópias diferentes que forneceriam estimativas significativamente diferentes de filogenia, em organismos superiores (HUELSENBECK et al., 1996).

Vários estudos têm utilizado as diferenças nas sequências de nucleotídeos de porções de genes mitocondriais e nucleares para gerar informações sobre a estrutura populacional e/ou relações filogenéticas de várias espécies de insetos, em especial a subordem Pentatomomorpha (XIONG; KOCHER, 1991; GASPARICH et al., 1995; ZHANG et al., 1995; BESANSKY et al., 1997; LEHMANN et al., 2000).

Pentatomomorpha é a segunda subordem em número de espécies e um dos grupos mais importantes em Heteroptera. Entretanto, as relações filogenéticas entre membros desta subordem não estão bem estabelecidas. Li et al. (2005) reconhecem quantidades diferentes de superfamílias dentro da subordem Pentatomomorpha podendo variar de quatro a sete (Aradoidea, Pentatomoidea, Coreoidea, Pyrrhocoroidea, Idiostoloidea, Lygaeoidea e Piesmatoidea). Somente Aradoidea e Pentatomoidea são reconhecidas como monofiléticas. Não existe consenso para a posição de Piesmatidae e Idiostolidae. As outras superfamílias Coreoidea, Lygaeoidea e Pyrrhocoidea foram definidas com base em algumas diferenças morfológicas. Na tentativa de auxiliar no esclarecimento da filogenia de Pentatomomorpha, Li et al. (2005) analisaram sequências parciais do gene 18S ribossomal nuclear e o gene *COI* em combinação ou isoladamente

para gerar uma filogenia molecular preliminar utilizando 17 famílias de Pentatomomorpha, pertencentes às superfamílias Coreoidea, Lygaeioidea, Pyrrhocoroidea, Pentatomoidea e Aradoidea. Os resultados sugeriram a monofilia de Pentatomomorpha e coloca Aradoidea como grupo irmão de Trichophora. Este último foi agrupado em duas linhagens maiores, uma sendo Pentatomoidea e outra Lygaeoidea, Coreoidea e Pyrrhocoroidea. A análise filogenética de grupos combinados de árvores de máxima verossimilhança e evolução mínima apoiam monofilia para Pentatomoidea. Em todas as análises Pyrrhocoroidea foi polifilética; a monofilia de Lygaeoidea foi apoiada somente pela análise de evolução mínima e Coreoidea foi polifilética exceto pela árvore de máxima parcimônia dos dados combinados. Ambos os dados, moleculares e morfológicos, indicaram que a superfamília Coreoidea deveria ser revisada. Li et al. (2005) sugeriram que o segmento de *COI* sozinho não poderia ser um marcador molecular ótimo para filogenia de Pentatomomorpha**.**

A família Gerridae, pertencente à subordem Heteroptera, tem sido explorada para traçar o seu cenário evolutivo. Damgaard e Sperling (2001) analisaram a relação filogenética entre espécies aquáticas de passadas largas do gênero *Gerris* (Heteroptera: Gerridae) com base nas características morfológicas e na análise molecular utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*COI*) e o nuclear que codifica o fator de elongação 1 alfa (*EF-1α*). Esse estudo determinou que *Macrogerris* é o subgênero basal em *Gerris*.

Os genes mitocondriais, citocromo b (*CYTB*) e citocromo oxidase subunidade I (*COI*) foram utilizados para estudos de biologia populacional e observação das relações filogenéticas em espécies do complexo *Phyllosoma*, *Triatoma rubida* e *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Segundo Pfeiler et al. (2006), para ambas as espécies, nenhum haplótipo para ambos os genes foi compartilhado entre as principais regiões geográficas (Baja Califórnia Sur, Sonora, e Arizona). Análises das sequências de aminoácidos dos genes *COI* e de *CYTB* foram concordantes com os resultados das sequências de nucleotídeos. Todos os membros do complexo, incluindo *T. recurva* e *T. dimidiata*, compartilharam cinco substituições de aminoácidos no segmento estudado do gene *COI*.

Memon et al. (2006) descreveram uma nova espécie de *Halys fabricius* (Pentatomidae: Pentatominae: Halyini) baseado na morfologia e dados de

sequência de DNA mitocondrial (*COI* e *COII*) e com isto demonstraram o valor das sequências de DNA para responder questões taxonômicas que são difíceis de serem resolvidas com base somente na morfologia.

II. OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

a) Selecionar as características morfológicas e citogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a serem utilizadas para análises filogenéticas;

b) Avaliar o potencial informativo da variabilidade genética nas espécies de Heteroptera das famílias Coreidae e Pentatomidae, a partir das análises das sequências geradas dos genes mitocondriais citocromo oxidase subunidade I (*COI*) e o ribossomal 16S e o gene nuclear ribossomal 18S;

c) Inferir um cenário evolutivo dessas espécies, a partir das sequências gênicas geradas;

d) Inferir relações filogenéticas das espécies estudadas a partir das análises de neighbor-joining, inferência Bayesiana e máxima verossimilhança;

e) Fornecer subsídios para as interpretações filogenéticas do grupo com relação às diversas características apresentadas e;

f) Explorar, organizar e revisar os dados da literatura relativos aos genes codificantes de proteínas das espécies de Hemiptera cujos genomas mitocondriais completos estão descritos na literatura, com o intuito de fornecer dados para análises futuras combinadas com outros marcadores.

A presente pesquisa propôs obter informações a respeito das questões que envolvem o padrão evolutivo da pigmentação da bainha peritoneal e dos lobos testiculares, a distribuição dos lobos formadores de espermatozoides não fertilizantes na família Pentatomidae, a provável origem da diversidade cariotípica em Coreidae (se por fusão ou fissão), utilizando como base as relações filogenéticas reconstruídas com as sequências dos genes *COI*, 16S e 18S, além de fornecer suporte para o uso de tais genes na exploração de relações filogenéticas em Heteroptera.

III. CAPÍTULO 1

Analysis of the mitochondrial *COI* gene and its informative potential for evolutionary inferences in the Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) families

Hederson Vinicius de souza[1], Sandra Regina de Carvalho Marchesin[2], Mary Massumi Itoyama[1†].

[1]UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]UNIP - Universidade Paulista, Campus Juscelino Kubitschek São José do Rio Preto, SP, Brasil.
[†]mary@ibilce.unesp.br

Key words: Cytochrome oxidase I, Phylogeny, Gene, Mitochondria, DNA Barcoding

Abstract: The mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) gene is one of the most popular markers used for molecular systematics. Fragments of this gene are often used to infer phylogenies, particularly the region near the 5' end, which is used by the DNA Barcoding Consortium. With a growing number of sequences being deposited in the DNA Barcoding database, there is an urgent need to understand the evolution of this gene and its evolutionary relationship between species; it is also important to analyze the informative potential of the gene for phylogenetic inferences for each group used. In this study, the *COI* gene was divided into three distinct regions: a 5' region, a central region and a 3' region. The nucleotide composition in these regions was analyzed, and their potential for making informative phylogenetic inferences using species in the Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) families was assessed. It was found that the same region in the cytochrome oxidase I gene may present different behaviors for each family analyzed and that using additional regions from the same gene may even prejudice the analysis.

Resumo: O gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COI) é um dos marcadores mais populares utilizado em sistemática molecular. Fragmentos deste gene são frequentemente utilizados para inferências filogenéticas, especialmente a região perto da extremidade 5', a qual é utilizada como "código de barras" baseado em DNA. Com o crescente número de sequências depositadas nas bases de dados disponíveis atualmente, há a necessidade urgente de se compreender o padrão evolutivo deste gene e sua relação evolutiva entre as espécies. É, também, importante analisar o potencial informativo do gene para inferências filogenéticas para cada grupo utilizado. Neste estudo, o gene COI foi dividido em três regiões distintas, incluindo a região perto da extremidade 5', a região central e a região perto da extremidade 3'. Nestas regiões foram analisadas as composições de nucleotídeos, bem como, o potencial informativo para inferências filogenéticas utilizando espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera). Com este trabalho foi possível verificar que as mesmas regiões do gene citocromo oxidase I podem apresentar comportamentos diferentes para cada família analisada e adições de regiões do mesmo gene pode até prejudicar as análises.

Introduction

The mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) gene is one of the most popular markers used for molecular systematics. Portions of this gene are often used to infer phylogenies. In addition, *COI* is currently the focus of considerable interest, especially its 5' portion, which is used by the DNA Barcoding Consortium (Hebert et al. 2003; Stoeckle 2003). This region is comprised of approximately 640 nucleotides (Folmer et al. 1994) and has been used as a unique identification code for many species. Additionally, this region is used to facilitate the correct identification of specimens and the discovery of new species (Moritz and Cicero, 2004).

Several studies indicate that this segment could be effectively used as a DNA barcode to identify various species of animals, such as butterflies or fish (Hebert et al., 2003, Ward et al., 2009). An increasing number of sequences are being deposited in the DNA Barcoding Database (Monaghan et al., 2006); thus, there is an urgent need to understand the evolutionary pattern of this gene among species. It is also important to analyze the informative potential of the gene for inferring phylogenies for each group studied. These studies have even suggested changing the segment used for the DNA

barcoding initiative; such suggestions include using the region encoding the *COI-COII* genes or using an additional region of the same gene, such as the I3-M11 portion in species in which this gene is conserved. Other studies have suggested maximizing the rate of nucleotide divergence or its evolutionary consistency rate to improve accuracy of the DNA barcoding as a marker of mtDNA divergence and the robustness of the phylogenetic signal. Ideally, a region should be chosen to simultaneously maximize all of these factors; however, some tradeoffs will be inevitable (Erpenbeck et al. 2006; Roe and Sperling, 2007).

Nucleotide substitution patterns may play an important role in obtaining information about phylogenetic relationships and the population structure of different organisms, and such variations may show increased diversification among independent lineages and increasingly divergent taxa (Galtier et al. 2006).

In addition, molecular characteristics originally used in the identification or classification of a species, such as those deposited in DNA Barcoding Databases, are often subsequently incorporated in studies of phylogenetic approaches and/or phylogeography. Therefore, it is important to study how variations in phylogenetic information result in changes in more inclusive taxonomic levels (Galtier et al., 2006).

Phylogenetically informative characteristics gradually accumulate in the form of polymorphisms in diverging lineages, and the more divergent the lineage, the more these characteristics lead to increased phylogenetic information (Galtier et al., 2006). However, the probability of multiple mutations at a particular site increases at the same time, resulting in the loss of informative characteristics (saturation) for a given taxonomic level, leading to erroneous evolutionary interpretations (Galtier et al. 2006; Schneider, 2007).

With regards to more inclusive taxa, the *COI* gene is considered to be conserved among Metazoa (Jacobs et al., 1988) and has been used to analyze phylogenetic relationships within the Arhynchobdellida order (Borda and Siddall, 2004) and Pteriomorphia subclass (Matsumoto, 2003), although it is often used to distinguish between families and less inclusive taxonomic lineages (Pollock et al. 1998; Damgaard and Sperling, 2001).

In the Heteroptera suborder, the *COI* gene, along with other genes and morphological characteristics, has been used to infer the evolution of some taxa, such as

the infraorder (Pentatomomorpha), superfamily (Pentatomoidae), family (Anthocoridae) and genus (Limnogonus) (Li, et al, 2005; Muraji, 2000, Jakob, 2010; Grazia, 2008).

In this study, the *COI* gene was divided into three distinct regions, including a region near the 5' end, which is used in the DNA barcoding consortium, a central region and a region near the 3' end (an underexplored region of the gene) Each of these regions were analyzed for nucleotide composition and informative potential for phylogenetic inferences using species in the Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) families.

Material and Methods

In this study, we analyzed the following species: *Anasa bellator*, *Anisoscelis foliacea*, *Athaumastus haematicus*, C*atorhintha guttula*, *Chariesterus armatus*, *Dallacoris obscura*, *Dallacoris pictus*, *Hypselonotus fulvus*, *Leptoglossus gonagra*, *Leptoglossus zonatus*, *Sphictyrtus fasciatus* and *Zicca annulata*, belonging to the family Coreidae and *Antiteuchus tripterus*, *Chlorocoris complanatus*, *Dichelops melacanthus*, *Edessa meditabunda*, *Euschistus heros*, *Loxa deducta*, *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus*, *Oebalus ypsilongriseus*, *Piezodorus guildinii*, *Platycarenus umbraculatus*, *Proxys albopunctulatus* and *Thyanta perditor*. These species belong to the Pentatomidae family (Table 1), were collected in the São Jose do Rio Preto, SP, Brazil region (20° 47' 13" S, 49° 21' 38 " W) and were fixed in absolute ethanol. To obtain the DNA fragments, the thoracic muscles of the collected specimens were used according to the protocol described by Bargues and Mas-Coma (1997).

Two pairs of primers were used based on their descriptions in the literature (Table 2). Due to the absence of specific primers for the 3' end, three other primers were designed (V-VII) (Table 2) with the Geneious v.5.0 program using the complete sequences of the *COI* gene from the *Halyomorpha halys* and *Nezara viridula* species in the Pentatomidae family (accession numbers NC_013272 and NC_011755) and *Hydaropsis longirostris* in the Coreidae family (accession number NC_012456) species.

Seven primers were used for the analysis of the *COI* gene, which are described in Table 2. The annealing region of each primer is shown in Figure 1; these regions were named Region 1, which is near the 5' end and contains approximately 650

bp, Region 2 (intermediate), which contains approximately 450 bp, and Region 3, which is near the 3' end and contains nearly 400 bp (Figure 1).

With regards to the primers for region 3, it was not possible to amplify fragments for this region in the following species: *L. gonagra* and *H. fulvus* in the Coreidae family and *C. complanatus*, *M. v-luteum* and *P. umbraculatus* in the Pentatomidae family. Thus, this region was only used analyzes jointly with the other concatenated regions.

Amplification of the gene regions was performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler in a 10 µL total reaction volume with 100 ng of DNA, 0.2 mM of each primer pair, 100 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 1.5 to 3 mM $MgCl_2$ and 0.5 units of Platinum® DNA polymerase (Invitrogen).

Sequencing reactions were performed using an ABI 3730 DNA Analyzer sequencer (Applied Biosystems). The sequencing reactions were performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. The sequences were analyzed using Sequencing Analysis 5.3.1 software with the KB base caller.

The three amplified gene regions were aligned with the ClustralW program (Thompson et al., 1997) and analyzed in the MEGA5 program (Tamura et al., 2011). Distance analyses were performed using the Paup4 program (Swofford, 2000), and the mean, standard deviation and minimum and maximum values were determined using the Minitab® Statistical Software.

Neighbor-joining phylogenetic inferences were performed using the K2P distance model in the MEGA5 program (Tamura et al., 2011), and Bayesian inferences were performed with the MrBayes v3.2 program (Ronquist et al. 2012). Four unrooted phylogenetic relationships were generated and analyzed for each family while taking into account the analysis of the nucleotides in regions 1, 2 and 3.

Results

The complete sequences of the cytochrome oxidase I genes found in the literature include 1.533, 1541 and 1.536 base pairs for *Hydaropsis longirostris* (Coreidae) (accession number NC_012456), *Halyomorpha halys* (accession number NC_013272) and *Nezara viridula* (Pentatomidae) (accession number NC_011755), respectively, with an average of 1537 base pairs for all three species. In the analysis of

the three gene regions, 20 sequences (one for each species) were obtained with an average of 1443 base pairs (93.9% of the gene) belonging to the *Anasa bellator*, *Anisoscelis foliacea*, *Athaumastus haematicus*, *Catorhintha guttula*, *Chariesterus armatus*, *Dallacoris obscura*, *Dallacoris pictus*, *Hypselonotus fulvus*, *Leptoglossus gonagra*, *Leptoglossus zonatus*, *Sphictyrtus fasciatus* and *Zicca annulata* species in the Coreidae family and the *Antiteuchus tripterus*, *Chlorocoris complanatus*, *Edessa meditabunda*, *Euschistus heros*, *Loxa deducta*, *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus*, *Oebalus ypsilongriseus*, *Platycarenus umbraculatus* and *Thyanta perditor* species in the Pentatomidae family (Table 1). After the alignment was performed, 1.379 nucleotides, including 625, 386 and 368, belonged to regions 1, 2 and 3, respectively, in the cytochrome oxidase I gene in the Coreidae family, and 1.378 nucleotides, including 621, 393 and 364 belonged to regions 1, 2 and 3, respectively, in the Pentatomidae family.

When we performed an analysis of the nucleotide variation in the three codon sites, the 3rd codon position demonstrated conservation ranging from 6.2 to 10.9% for these sites in the Coreidae family (Table 3) and from 5.5 to 9.6% in the Pentatomidae family (Table 4). With regards to the 1st and 2nd positions, the conservation levels ranged from 41.8 to 51.5% in the Coreidae family (Table 3) and from 40.9 to 53.6% in the Pentatomidae family (Table 4).

Regarding the variable sites, 17.6 to 18.7% (Coreidae) and 18.0 to 22.6% (Pentatomidae) of these sites were located within the 1st position of the codon and 3.4 to 8.4% (Coreidae) and 4.7 to 11.0% (Pentatomidae) were in the 2nd codon position (Tables 3 and 4). In the 3rd codon position, the variations ranged from 73.3 to 78.9% (Coreidae) and 69.0 to 77.1% (Pentatomidae) for informative sites (Tables 3 and 4).

In this analysis, we found that region 3 was the most conserved in the Coreidae family, with 64.4% of the sites demonstrating conservation, while in the Pentatomidae family, region 2 demonstrated the highest number of conserved sites, with 63.4% of sites showing conservation. Region 1 had the highest percentage of variability in both families: 37.6% in Coreidae and 41.4% in Pentatomidae.

The percentage of conserved amino acid residues was 87.4, 89.1 and 79.5% for gene regions 1, 2 and 3, respectively, in the Coreidae family (Table 3), and 77.7, 83.8 and 70.0%, respectively, in the Pentatomidae family (Table 4). Thus, the

most conserved gene region in both families was region 2 with regard to the amino acid residues.

At the third position, there was an average frequency of AT nucleotides of 81.7, 85.3 and 83.5% for regions 1, 2 and 3, respectively, in the Coreidae family (Table 3) and 82.1, 83.0 and 82.4% for regions 1, 2 and 3, respectively, in the Pentatomidae family (Table 4). In the 1st and 2nd positions of region 1, the AT percentage was 54.2 and 54.9%, respectively, for the Coreidae family and 55.0 and 55.2%, respectively, for the Pentatomidae family. In region 2, the AT values were 56.6 and 59.5% for the 1st and 2nd positions, respectively, in the Coreidae family, and 59.2 and 61.8% for the 1st and 2nd positions, respectively, in the Pentatomidae family. In region 3, frequencies of 67.7 and 64.7% to Coreidae and frequencies of 67.2 and 64.0% were found for the 1st and 2nd positions, respectively, in the Pentatomidae family. We found that region 1 demonstrated a lower average AT content compared with the other two regions, with contents of 63.6 and 64.1% for the Coreidae and Pentatomidae families, respectively, while the third region demonstrated the highest average percentage of AT nucleotides in both of the analyzed families with percentages of 71.9 and 71.2% for the Coreidae and Pentatomidae families, respectively.

The average divergences obtained using distance matrices (K2P) were 19.9, 17.4 and 17.3 for regions 1, 2, and 3, respectively, for the Coreidae family (Table 3) and 19.3, 16.3 and 18.8% for the Pentatomidae family (Table 4).

In a neighbor-joining phylogenetic analysis of the Coreidae family, we observed paraphyly of the Coreini and Anisoscelidini tribes when analyzing the first and second regions of the cytochrome oxidase 1 gene (Figures 2a and b) and both of the concatenated regions (Figure 2c). When regions 1, 2 and 3 were concatenated, there was paraphyly of only the Anisoscelidini tribe (Figure 2d). There was inconsistent clustering for all analyses except for the *Dallacoris* genus, which demonstrated high bootstrap levels. When the first and second regions were concatenated, we observed an evolutionary scenario similar to that demonstrated for region 1, and there was a decrease in the bootstrap rate for most branches (Figure 2c). Concatenation of region 3 with regions 1 and 2 led to a slight increase in the bootstrapping of some of the branches, and the *A. foliacea* species was clustered with *A. haematicus*, recuperating the monophyly of the Coreini tribe (Fig. 2d).

A Bayesian inference of the Coreidae family paraphyly of the Coreini and Anisoscelidini tribes was visualized for all analyses and involved region 1 (Figure 3a), region 2 (Figure 3b), concatenated regions 1 and 2 (Figure 3c) and concatenated regions 1, 2 and 3 (Figure 3d). In these four studied inferences, different evolutionary scenarios were formed when they were compared with each other, and only the branch involving species for the *Dallacoris* and *Leptoglossus* genera remained unchanged in all the analyses.

A neighbor-joining phylogenetic analysis of the cytochrome oxidase gene region 1 in the Pentatomidae family revealed paraphyletic clusters containing the Chlorocorini and Discocephalini tribes (Figure 4a). When analyzing the region 2 of the same gene, similar to the Chlorocorini and Discocephalini tribes, the Carpocorini and Pentatomini tribes formed paraphyletic clusters. Additionally, the *Oebalus* genus did not form a monophyletic cluster (Figure 4b). When concatenating these two regions, it was observed that the Discocephalini, Pentatomini and Chlorocorini tribes were paraphyletic (Figure 4c), and the Carpocorni tribe became paraphyletic as well (Figure 4d). In all analyses, clusters were formed with low consistency in the branches, with the exception of the *Oebalus* genus, when analyzing the three concatenated gene regions.

For the Bayesian inference of Pentatomidae family species using region 1 of the gene, it was found that only the Carpocorini tribe was paraphyletic (Figure 5a). However, only region 2 led to paraphyly for the Carpocorini, Chlorocorini, Pentatomini and Discocephalini tribes (Figure 5b). When regions 1 and 2 were concatenated, paraphyly remained for these tribes (Figure 5c); this paraphyly also remained following the addition of region 3 in the analysis (Figure 5d).

Discussion

Segments currently used for DNA barcoding can provide different levels of conservation for each group examined. Erpenbeck et al. (2006) suggested the inclusion of an additional *COI* gene region in the DNA barcoding analyses of sponges because the *COI* gene is more conserved in this group, precluding accurate species identification. In our analysis, we found that there is homogeneity when analyzing the conserved sites in three distinct gene regions, ranging from 62.4 to 64.4% for the Coreidae family and from 58.6 to 63.4% for the Pentatomidae family. As expected, the

most conserved sites were mainly found in the 1st and 2nd codon positions; the 3rd position had few conserved sites with a maximum homogeneity of 10.9%. In general, by analyzing amino acid residues, there was a high level of conservation in both families, and the second region had a higher conservation level. This finding means that there are few variable sites for evolutionary inference in the Coreidae and Pentatomidae families. Region 3, which is more variable, possessed more informative residues (20.5 and 30.0% for Coreidae and Pentatomidae, respectively). Unfortunately, this variability may be an obstacle for designing primers, which is the case for the *L. gonagra*, *H. fulvus* (Coreidae), *C. complanatus*, *M. v-luteum* and *P. umbraculatus* (Pentatomidae) species.

Higher AT nucleotide frequency has been reported to be a common feature for insect mitochondrial DNA (Simon et al., 1994). In our analysis, the AT frequency at the third site of each codon was higher than that in the other two. This difference may be due to the degeneracy of the third codon position, which is characteristic of the genetic code, which may lead to saturation at this codon position. When analyzing the cytochrome oxidase I gene divided into three regions, we found an increase in the AT percentage at the 1st and 2nd codon positions of region 3 in the Coreidae and Pentatomidae families. For the species belonging to the *Ips* genus (Coleoptera: Scolytidae), as described in the study by Cognato and Sperling (2000), saturation was higher in the third codon of the cytochrome oxidase I gene followed by the 1st and 2nd codons. However, in this genus, the third codon had the most phylogenetically informative sites; therefore, the authors used this position to infer phylogenetic relationships. However, nucleotide substitution saturation may decrease the potential of the phylogenetically informative characteristics, thus decreasing phylogenetic consistency (Cognato; Sperling, 2000).

In fact, in our analysis, we found that there is informative potential for evolutionary inferences using the third codon, with a frequency of site variation of approximately 70% in both families However, the higher AT nucleotide frequency in this codon may lead to inconsistent phylogenetic analysis in higher taxa, and it was found that just over 80% of the nucleotides in this position are thymine and adenine bases. To avoid this bias, some authors preferred to use the translated amino acid code, but when translated into amino acids, phylogenetic analyses can produce unresolved

trees, as verified by Cognato and Sperling (2000). On average, region 3 had a higher percentage of AT nucleotides.

Saturation can occur in species that diverged earlier in their evolutionary histories. In a comparison of pairwise divergence among the studied species (K2P distance), it appears that region 1 had a higher average divergence than the other regions, with frequencies of 19.9% for Coreidae and 19.3% for Pentatomidae; however, in general, we found that the average divergence (K2P) in both families for the three regions analyzed did not exceed 20%. Previous studies of various animal groups have reported a minimum distance for interspecific sister species of less than 2% (Klicka; Zink, 1997; Johns; Avise, 1998, Hebert et al. 2004; Ward et al. 2005; Yoo et al., 2006). The average divergence for more inclusive taxa depends on the number of congeners in the genera analyzed, i.e., the average divergence is lower when there are a greater number of species within the same genus (JUNG et al., 2011). Our analyzed species belong to different tribes, and in the case of the Pentatomidae family, they belong to distinct subfamilies (Table 1). However, the differences are less pronounced and may reflect gene divergence at the family level for Heteroptera; however, more families should be analyzed with respect to the cytochrome oxidase I gene to define real divergence at this taxonomic level.

Although the results from the analysis of the Coreidae and Pentatomidae families were independently analyzed, the results were similar with regards to the nucleotide description and rate of divergence for both families, suggesting that the *COI* gene evolves similarly for both families.

With regards to the phylogenetic analysis obtained by the neighbor-joining method using region 2 as a marker, phylogenetic inference using the Bayesian inference method yielded less paraphyletic clustering for the Coreidae family; however, the use of region 1 as a marker for phylogenetic inference yielded fewer paraphyletic clusters in the Pentatomidae family. In both cases, the robustness of the branches was not significantly improved when adding gene regions in analysis. In fact, the branches in the analysis demonstrated few bootstraps and were considered consistent, i.e., with frequencies less than 70% (Hillis; Bull, 1993). Likewise, the evolutionary scenarios obtained through Bayesian inference demonstrated paraphyly of the Anisoscelidini and

Coreini tribes and consistently low branching, with the exception of the genera *Dallacoris* and *Leptoglossus*.

The results obtained with region 1 for the Pentatomidae family exhibited fewer paraphyletic clusters by the neighbor-joining analysis than by the Bayesian inference. However, Bayesian inference using region 1 formed a paraphyletic cluster only for the Carpocorini tribe, indicating its potential for evolutionary analyses. By adding another region of the same gene in this analysis, paraphyletic clusters were formed with tribes, beyond Carpocorini, demonstrating that, in this case, adding more regions of the same gene may negatively affect the analysis.

The low consistencies between the branches may be due to divergence of the species, which cannot recuperate the evolutionary history of the taxonomic family level. Therefore, it is essential to analyze other genes that are informative at the taxonomic level to recover the evolutionary history of these species by a robust method. Indeed, Li et al. (2005) suggested that the *COI* segment alone was not a suitable marker for the molecular phylogeny of Pentatomomorpha.

At the family level, region 1 rarely supported a satisfactory resolution (Brown et al., 1994; Miura et al., 1998) and was often demonstrated to be unreliable (Dowton; Austin, 1997; Mardulyn; Whitfield, 1999). While they are more inclusive in taxonomic levels, cytochrome oxidase I sequences are not suitable for resolving relationships (Liu; Beckenbach, 1992; Howland; Hewitt, 1995; Frati et al., 1997).

Similar to region 1, the three regions analyzed in this study were unable to resolve phylogenetic inferences alone in a robust manner for the analyzed families. Thus, this study demonstrates that regions of the same gene may exhibit different behaviors for each family and that the addition of other regions from the same gene may not be necessary or may negatively affect the analysis. The study of these gene segments should be viewed with caution because they are more randomized than informative, requiring analysis with other genes or morphological characteristics to form robust evolutionary scenarios for the reliable analysis of the evolutionary history of these two families.

Acknowledgments

We would like to give special thanks to Dr. Jocélia Grazia of the Department of Zoology of the Federal University of Rio Grande do Sul and Dr. Aline Barcellos of the Museum of Natural Sciences of Porto Alegre State, Brazil, who helped with specimen identification.

This study was financially supported by the São Paulo Research Foundation – FAPESP, the Foundation for the Development of the São Paulo State University (FUNDUNESP), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. **Mol Biol Evol.** v. 14, p. 569-577, 1997.

BORDA, E.; SIDDALL, M. E. Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida): phylogenetic relationships and evolution. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 30, p. 213–223, 2004.

BROWN, J. M.; PELLMYR, O.; THOMPSON, J. M.; HARRISON, R. G. Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. **Mol. Biol. Evol.** v. 11, p. 128–141, 1994.

COGNATO A. I., SPERLING F. A. H. Phylogeny of *Ips* DeGeer Species (Coleoptera: Scolytidae) Inferred from Mitochondrial Cytochrome Oxidase I DNA Sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 14, n. 3, p. 445–460, 2000.

DAMGAARD, J.; SPERLING, F. A. H. Phylogeny of the water strider genus *Gerris* Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on *COI* mtDNA, EF-1α nuclear DNA and morphology. **System. Entomol.** v. 26, pp. 241–254, 2001.

DOWTON, M.; AUSTIN, A. D. Evidence for AT-transversion bias in wasp (Hymenoptera: Symphyta) mitochondrial genes and its implications for the origin of parasitism. **J. Mol. Evol.** v. 44, p. 398–405, 1997.

ERPENBECK D.; HOOPER J. N. A.; WÖRHEIDE G. CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'— are we sequencing a suboptimal partition? **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 550-553, 2006.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** v. 3, p. 294-297, 1994.

FRATI, F.; SIMON, C.; SULLIVAN, J.; SWOFFORD, D. L. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. **J. Mol. Evol.** v. 44, p. 145–158, 1997.

GALTIER, N.; ENARD, D.; RANONDY, Y.; BAZIN, E.; BELKHIR, K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Res.** v. 16, p. 215–222, 2006.

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.

HEBERT P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. 312, 2004.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HILLIS, D. M; BULL, J. J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p.182-192, 1993.

HOWLAND, D. E.; HEWITT, G. M. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. **Insect Mol. Biol.** v. 4, p. 203–215, 1995.

JACOBS, H. T.; ELLIOTT, D. J.; VEERABHADRACHARYA B. M.; FARQUHARSON, A. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. **J. Mol. Biol.** v. 202, p. 185-217, 1988.

JAKOB D.; BUZZETTI, F. M., MAZZUCCONI, S. A.; WEIR, T. A.; ZETTEL, H. A molecular phylogeny of the pan-tropical pond skater genus *Limnogonus* Stal 1868 (Hemiptera-Heteroptera: Gerromorpha-Gerridae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 2, p. 669-677, 2010.

JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1481–1490, 1998.

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

KLICKA J.; ZINK, R. M. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. **Science**, v. 277, p. 1666–1669, 1997.

LI H. M.; DENG R. Q.; WANG J. W.; CHEN Z. Y.; JIA F. L., WANG X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 2, p. 313-326, 2005.

LIU, H., BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 1, p 41–52, 1992.

MARDULYN, P.; WHITFIELD, J. B. Phylogenetic signal in the *COI*, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of *Microgastrinae* (Hymeoptera; Braconidae): Evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 12, p. 282–294, 1999.

MATSUMOTO, M. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA *COI* sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 27, p. 429–440, 2003.

MIURA, T.; MAEKAWA, K.; KITADE, O.; ABE, T.; MATSUMOTO, T. Phylogenetic relationships among subfamilies in higher termites (Isoptera: Termitidae) based on mitochondrial *COI*I gene sequences. **Ann. Entomolo. Soc. Am.** v. 91, p. 515–523, 1998.

MONAGHAN, M. T.; BALKE, M.; PONS, J.; VOGLER, A. P. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific island radiation. **Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol.** v. 273, p. 887–893, 2006.

MORITZ, C.; CICERO, C. "DNA Barcoding: Promise and Pitfalls". **PLoS Biol.** v. 2, n. 10, p. 1529–31, 2004.

MURAJI M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial *COI* fragment in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, p. 301-307, 2000.

POLLOCK, D. D.; WATT, W. B.; RASHBROOK, V. K.; IYENGAR, E. V. Molecular phylogeny for Colias butterflies and their relatives (Lepidoptera: Pieridae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 91, p. 524–531, 1998.

ROE A. D.; SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n 1, p. 325-345, 2007.

RONQUIST F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v.61 p.539-542, 2012.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Analise Filogenética**, 3a. Edição. Holos., 200p, 2007.

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

STOECKLE, M. Taxonomy, DNA and the bar code of life. **BioScience**, v. 53, p. 2–3, 2003.

SWOFFORD, D. L. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2000.

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

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Research, v. 25, n. 24, p. 4876-4881, 1997.

WARD R. D; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H , LAST, P. R.; HEBERT P. D. N. Barcoding Australia's fish species. **The Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.

WARD, R.; HANNER, R.; HEBERT, P. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **J. Fish Biol.** v. 74, p. 329-356, 2009.

YOO, H. S.; EAH, J. Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. J.; MIN, M. S.; PAEK, W. K.; LEE, H.; KIM, C. B. DNA barcoding Korean birds. **Molecules and Cells**, v. 22, p. 323–327, 2006.

Table 1. Classification of species in the Coreidae and Pentatomidae families and the in the NCBI database accession numbers used in this study. - = not analyzed.

Family	**Sub-family**	**Tribe**	**Species**	**Access Number**		
				Region 1	*Region 2*	*Region 3*
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	*Anisoscelis foliacea*	JQ037895	JQ218470	JQ218512
			Leptoglossus gonagra	JQ037902	JQ218477	-
			Leptoglossus zonatus	JQ037903	JQ218478	JQ218500
		Acanthocerini	*Athaumastus haematicus*	JQ037896	JQ218471	JQ218495
		Chariesterini	*Chariesterus armatus*	JQ037898	JQ218473	JQ218497
		Coreini	*Anasa bellator*	JQ031214	JQ218469	JQ218494
			Catorhintha guttula	JQ037897	JQ218472	JQ218496
			Hypselonotus fulvus	JQ037901	JQ218476	-
			Sphictyrtus fasciatus	JQ037904	JQ218479	JQ218501
			Zicca annulata	JQ037905	JQ218480	JQ218502
		Leptoscelini	*Dallacoris obscura*	JQ037899	JQ218474	JQ218498
			Dallacoris pictus	JQ037900	JQ218475	JQ218499
Pentatomidae	Discocephalinae	Discocephalini	*Antiteuchus tripterus*	JQ218456	JQ218481	JQ218503
			Platycarenus umbraculatus	JQ218466	JQ218491	-
	Edesinae	Edessini	*Edessa meditabunda*	JQ218459	JQ218484	JQ218507
	Pentatominae	Carpocorini	*Dichelops melacanthus*	JQ218458	JQ218483	JQ218506
			Euschistus heros	JQ218460	JQ218485	JQ218504
			Mormidea v-luteum	JQ218462	JQ218487	-
			Oebalus poecilus	JQ218463	JQ218488	JQ218509
			Oebalus ypsilongriseus	JQ218464	JQ218489	-
		Chlorocorini	*Chlorocoris complanatus*	JQ218457	JQ218482	-
			Loxa deducta	JQ218461	JQ218486	JQ218508
		Pentatomini	*Proxys albopunctulatus*	JQ218467	JQ218492	JQ218505
			Thyanta perditor	JQ218468	JQ218493	JQ218511
		Piezodorini	*Piezodorus guildinii*	JQ218465	JQ218490	JQ218510

Table 2. Primers used in the analysis of the cytochrome oxidase I gene in species of the Coreidae and Pentatomidae families (Heteroptera).

Region			**Sequence (5'->3')**	**Reference**
1	I	Forward	TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)
	II	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994)
2	III	Forward	AGCAGGAATTTCATCAATTTT	Muraji et al. (2000)
	IV	Reverse	CTGTAAATATGTGATGTGCTC	Muraji et al. (2000)
3	V	Forward	RTTGGAGGATTAACAGGAGTAA	Presente trabalho
	VI	Forward	TTATGAATGTTCTGMTGGNGG	Presente trabalho
	VII	Reverse	GGAGTAATTCTAGCCAACTC	Presente trabalho

Table 3. Analysis of the nucleotide composition, amino acid residues and divergences obtained for the three analyzed regions of the cytochrome oxidase I gene in species belonging to the Coreidae family.

	Region 1			**Region 2**			**Region 3**		
	Conserved	**Variables**		**Conserved**	**Variables**		**Conserved**	**Variables**	
Nucleotide Composition									*Total*
1st Position	164 (42,1%)	44 (18,7%)		106 (43,4%)	25 (17,6%)		99 (41,8%)	24 (18,3%)	
2nd Position	201 (51,5%)	8 (3,4%)		123 (50,4%)	5 (3,5%)		112 (47,3%)	11 (8,4%)	
3rd Position	25 (6,4%)	183 (77,9%)		15 (6,2%)	112 (78,9%)		26 (10,9%)	96 (73,3%)	
Total	390 (62,4%)	235 (37,6%)		244 (63,2%)	142 (36,8%)		237 (64,4%)	131 (35,6%)	1379
Aminoacid residues			*Total*			*Total*			*Total*
Total	181 (87,4%)	26 (12,6%)	207	114 (89,1%)	14 (10,9%)	128	97 (79,5%)	25 (20,5%)	122
AT%	Mean	Min-max.		Mean	Min-max.		Mean	Min-max.	
1st Position	54,2	51,2-58,7		56,6	53,5-58,9		67,7	64,2-69,9	
2nd Position	54,9	54,5-55,5		59,5	58,9-61,2		64,7	63,4-65,9	
3rd Position	81,7	71,5-88,0		85,3	78,9-93,0		83,5	75,4-91,8	
Total	63,6			67,1			71,9		
Divergence (K2P distance)									
Mean	19,9%			17,4%			17,3%		
Standard Deviation	3,2%			3,2%			3,8%		
Min-max	0,3-24,2%			0,3-23,4%			0,5-24,1%		

Table 4. Nucleotide Composition analysis, amino acid residues and divergences obtained to the three analyzed regions of the gene Cytochrome Oxidase I of the species belonging to Pentatomidae family.

	Region 1			**Region 2**			**Region 3**		
	Conserved	**Variables**		**Conserved**	**Variables**		**Conserved**	**Variables**	
Nucleotide Composition									*Total*
1st Position	149 (40,9%)	58 (22,6%)		104 (41,8%)	26 (18,0%)		93 (42,5%)	29 (20,0%)	
2nd Position	195 (53,6%)	12 (4,7%)		125 (50,2%)	7 (4,9%)		105 (47,9%)	16 (11,0%)	
3rd Position	20 (5,5%)	187 (72,7%)		20 (8,0%)	111 (77,1%)		21 (9,6%)	100 (69,0%)	
Total	364 (58,6%)	257 (41,4%)		249 (63,4%)	144 (36,6%)		219 (60,2%)	145 (39,8%)	1378
Aminoacid residues			*Total*			*Total*			*Total*
Total	160 (77,7%)	46 (22,3)%)	206	109 (83,8%)	21 (16,2%)	130	84 (70,0%)	36 (30,0%)	120
AT%	Média	Min-max.		Média	Min-max.		Média	Min-max.	
1st Position	55,0	53,4-56,9		59,2	56,6-61,5		67,2	66,1-68,6	
2nd Position	55,2	54,6-56,0		61,8	60,8-63,1		64,0	61,2-65,8	
3rd Position	82,1	74,4-88,9		83,0	77,9-90,8		82,4	75,2-87,6	
Total	64,1			68,0			71,2		
Divergence (K2P distance)									
Mean		19,3%			16,3%			18,8%	
Standard Deviation		3,2%			2,6%			3,4%	
Min-max		13,9-27,2%			10,4-21,4%			9,8-26,5%	

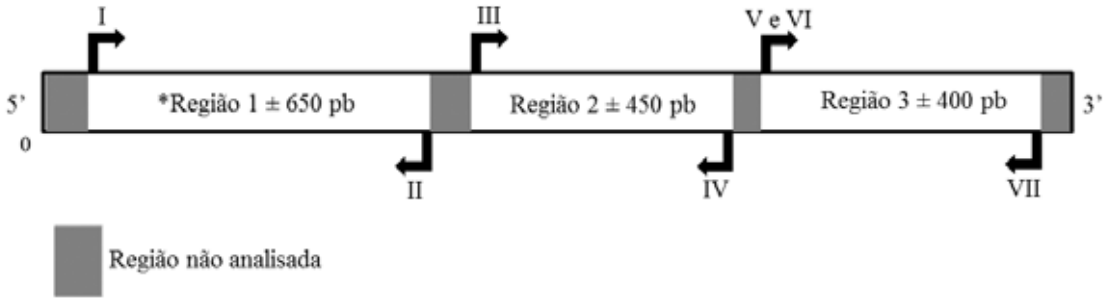

Figure 1. Regions of the cytochrome oxidase I gene, which have an average length of 1.574 bp. Primers I-VII are described in Table 2. *, Region used for DNA barcoding.

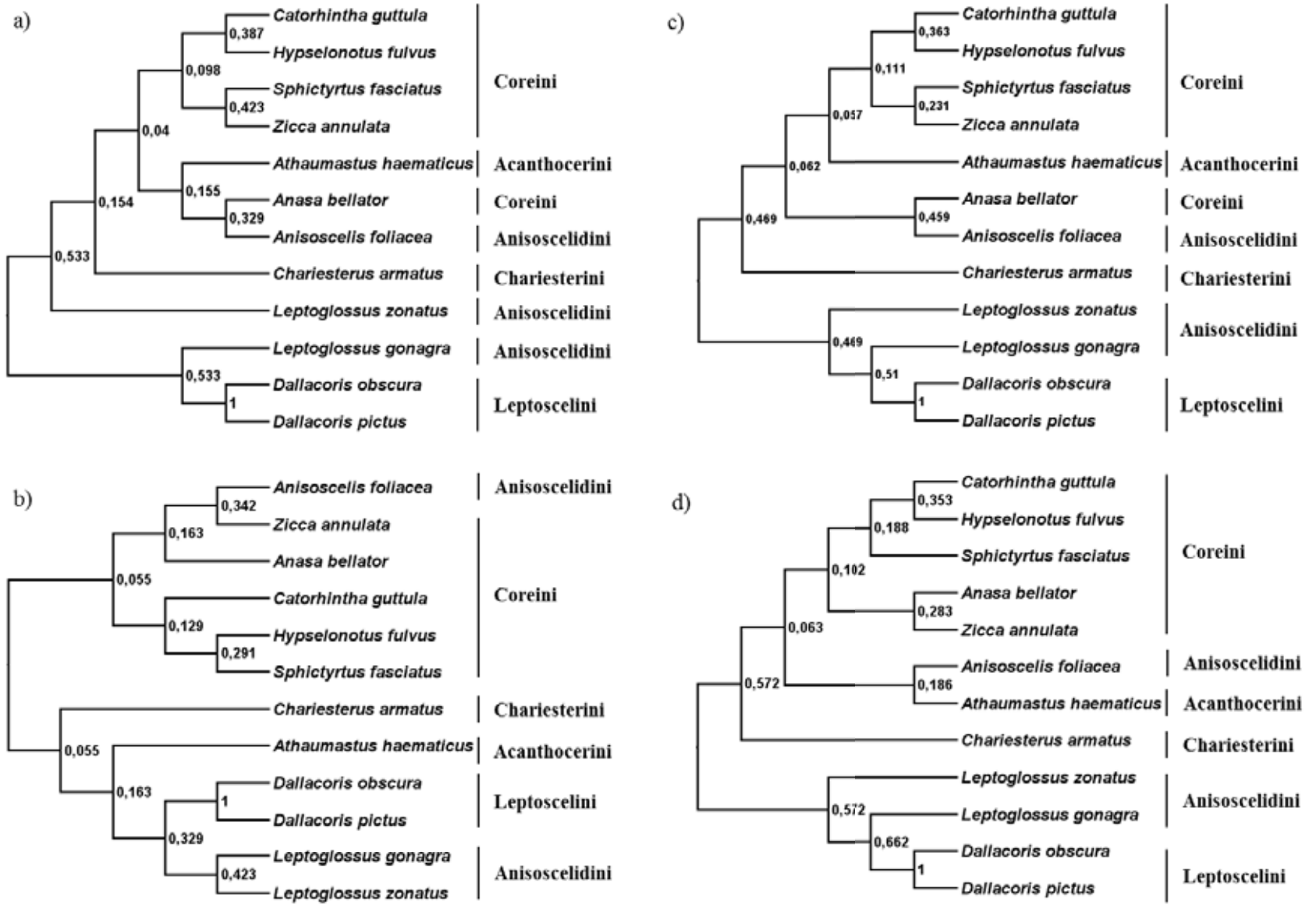

Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic analysis of regions of the cytochrome oxidase 1 gene in species in the Coreidae family, using Kimura 2-parameter distance. a) region 1; b) region 2; c) concatenated regions 1 and 2; and d) concatenated regions 1, 2 and 3.

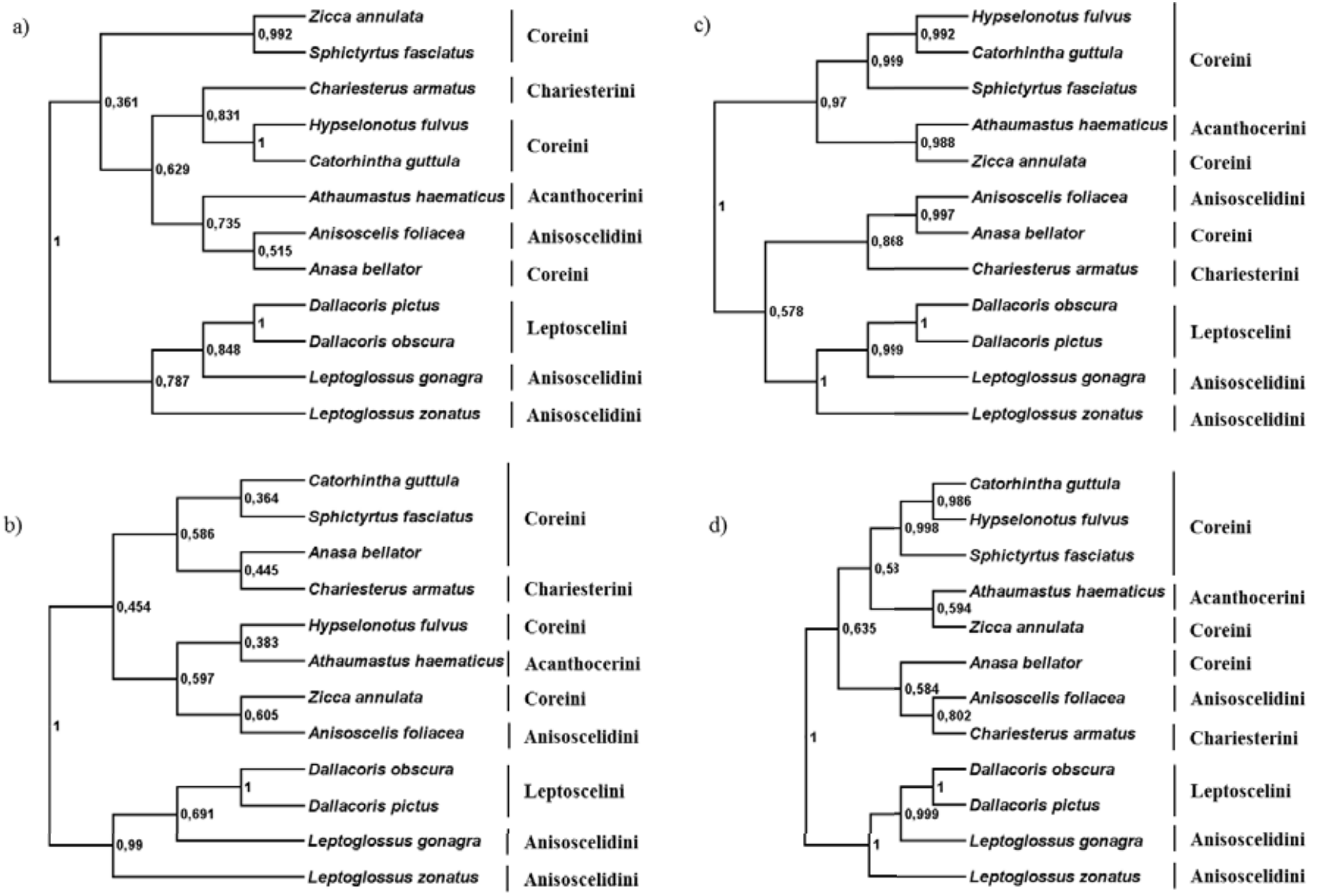

Figure 3. Bayesian inference using nucleotides from regions of the cytochrome oxidase 1 gene in species of the Coreidae family. a) region 1; b) region 2; c) concatenated regions 1 and 2; and d) concatenated regions 1, 2 and 3.

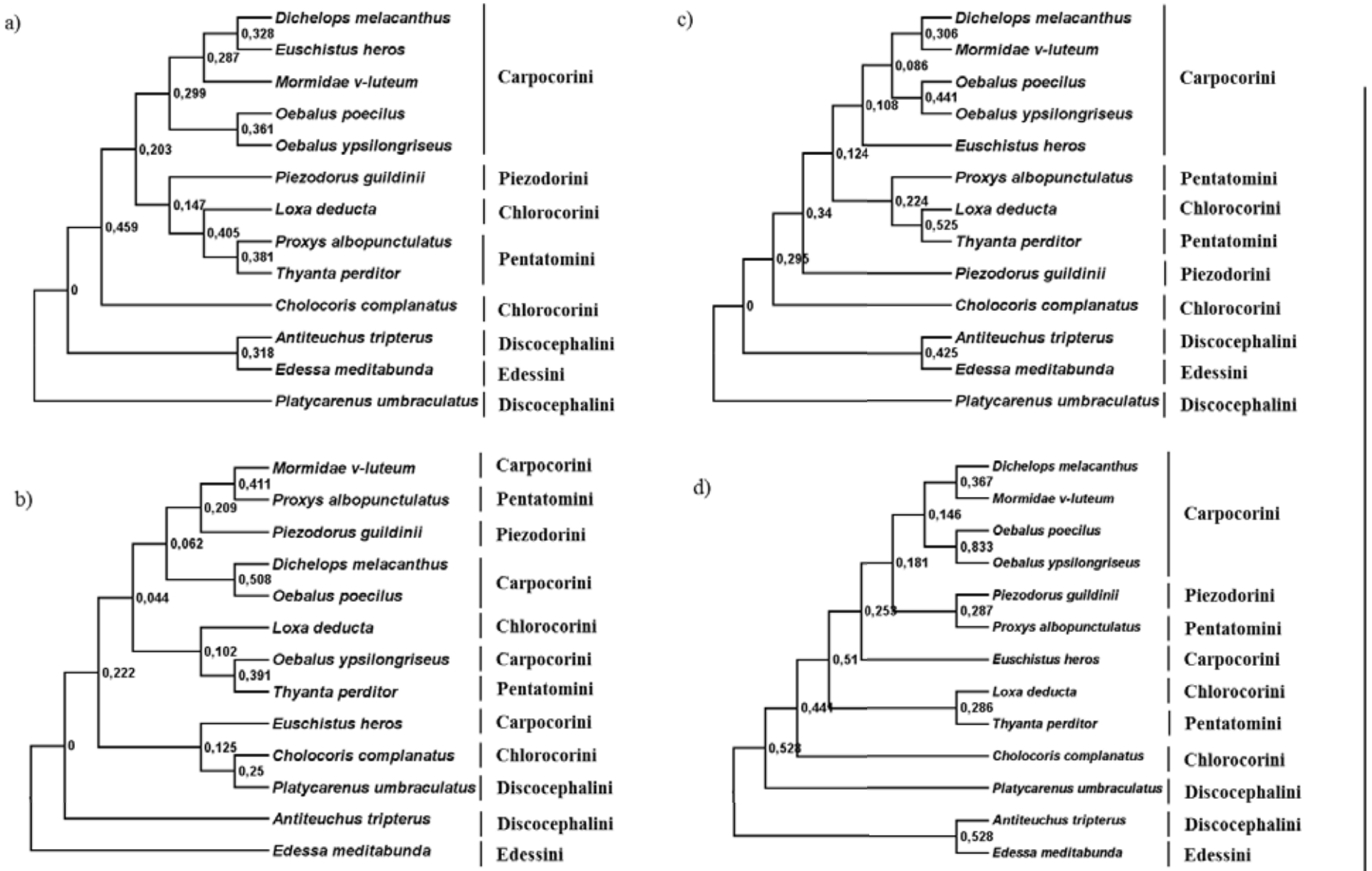

Figure 4. . Neighbor-joining phylogenetic analysis of regions of the cytochrome oxidase 1 gene in species of the Pentatomidae family using Kimura 2-parameter distance. a) region 1; b) region 2; c) concatenated regions 1 and 2; and d) concatenated regions 1, 2 and 3.

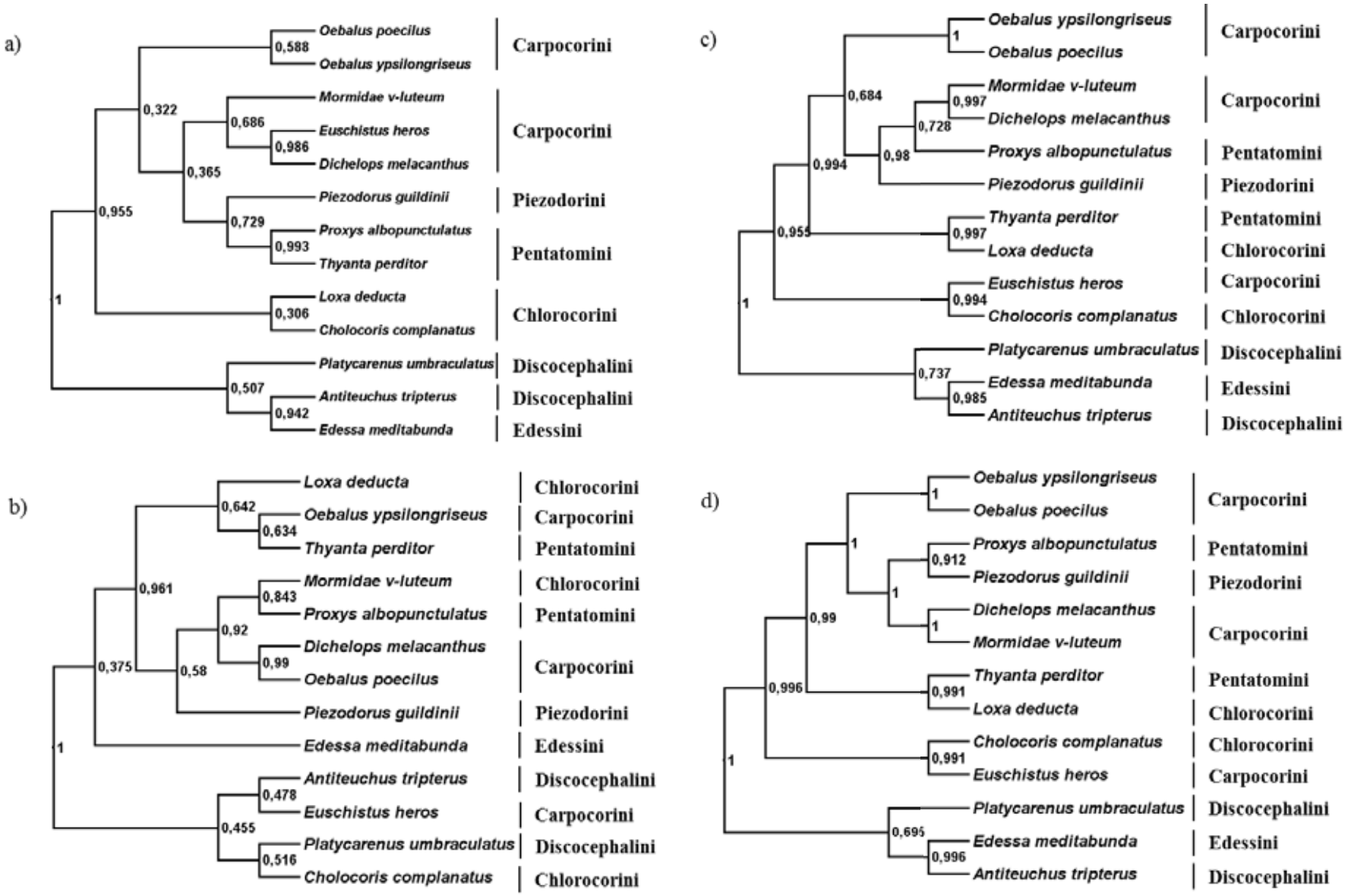

Figure 5. Bayesian inference using nucleotides from regions of the cytochrome oxidase 1 gene in species in the Pentatomidae family. a) region 1; b) region 2; c) concatenated regions 1 and 2; and d) concatenated regions 1, 2 and 3.

IV. CAPÍTULO 2

Análise dos genes 16S e 18S e seus potenciais informativos para inferências evolutivas nas famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera)

Hederson Vinicius de SOUZA[1], Cecília Ártico BANHO[1], Sandra Regina de Carvalho MARCHESIN[2], Mary Massumi ITOYAMA[1†].

[1]UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]UNIP - Universidade Paulista, Campus Juscelino Kubitschek, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
[†]mary@ibilce.unesp.br

Palavras-chave: Filogenia, Evolução, Gene Ribossomal, Gene Mitocondrial

Resumo

Atualmente encontram-se poucas informações moleculares de insetos da subordem Heteroptera. Contudo, estudos recentes têm utilizado os genes ribossomais 16S e 18S como marcadores para obtenção de inferências evolutivas. O presente trabalho objetiva descrever as características dos genes ribossomais mitocondrial 16S e nuclear 18S de duas famílias de Heteroptera, Coreidae e Pentatomidae, com foco em seu potencial evolutivo. Assim, foi feito o sequenciamento de parte dos genes ribossomais 16S e 18S de 25 espécies de Heteroptera, sendo 12 da família Coreidae e 13 da Pentatomidae. Tais sequências foram analisadas descritivamente e sob o ponto de vista filogenético. O fragmento do gene 18S foi o mais conservado, sendo de aproximadamente 97% dos sítios. No gene 16S foram evidenciados aproximadamente 70% de nucleotídeos AT, para ambas as famílias, enquanto que para o gene 18S foi de 50%. Esta taxa de transição e transversão é comparável às de outros grupos de insetos reportados na literatura. Sozinhos, ambos os marcadores formam agrupamentos parafiléticos, em especial, o 16S. O mesmo ocorre quando se analisa os fragmentos dos genes 18S e 16S concatenados. Contudo as informações de ambos os genes podem se somar. Desse modo, ambos os genes, em especial o 18S, podem auxiliar na busca por inferências

evolutivas nas famílias de Heteroptera apresentadas. Ainda, o gene 18S poderá resolver filogenias de taxons mais inclusivos em Heteroptera, embora mais análises devam ser feitas a fim de promover a formação de um cenário evolutivo robusto.

Introdução

Heteroptera, ou percevejos verdadeiros, é o maior e mais diverso grupo de insetos com metamorfose incompleta. Ele é geralmente tratado como uma subordem dos Hemiptera. Esta subordem possui sete infraordens com 79 famílias, sendo Pentatomidae uma das maiores (SCHUH; SLATER, 1995).

Além da diversidade de insetos, os Heteroptera apresentam certas particularidades entre as espécies, como números variáveis de lobos testiculares e colorações diferentes da bainha peritoneal (SOUZA et al., 2007a,b). Além destas características, algumas espécies da família Pentatomidae possuem um dos lobos testiculares com características morfológicas e celulares diferentes dos demais, levando à formação de espermatozoides com funções diversificadas (SOUZA; ITOYAMA, 2010). Somado a essas características, os Heteroptera possuem cromossomos holocinéticos, que podem levar à diversidade cariotípica (JACOBS, 2004), diversos sistemas cromossômicos do sexo e presença de m-cromossomos (BRESSA et al., 2001).

Apesar dessa ampla diversidade, há poucos trabalhos sobre os Heteroptera caracterizando suas divergências moleculares. Atualmente, pode-se verificar no banco de dados do NCBI 30 espécies de Heteroptera com seu genoma mitocondrial completamente sequenciado. Dentre estas, *Hydaropsis longirostris* pertencente à família Coreidae e *Halyomorpha halys* e *Nezara viridula* à Pentatomidae.

Alguns genes estão sendo estudados para serem utilizados como marcadores para formação de inferências evolutivas. Além do gene *COI*, amplamente utilizado, tem-se o gene mitocondrial ribossomal 16S que tem sido utilizado para reconstruções de filogenias em diversos níveis taxonômicos de invertebrados (SIMON et al., 1994) e o gene nuclear ribossomal 18S, que tem sido útil para inferências filogenéticas em eventos evolutivos antigos (HILLIS; DIXON, 1991).

Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo descrever as características dos genes ribossomais mitocondrial 16S e nuclear 18S e sua utilização

para interpretações filogenéticas em duas famílias de Heteroptera, Coreidae e Pentatomidae.

Material e Métodos

No presente trabalho foram analisadas as espécies: *Anasa bellator*, *Anisoscelis foliacea*, *Athaumastus haematicus*, *Catorhintha guttula*, *Chariesterus armatus*, *Dallacoris obscura*, *Dallacoris pictus*, *Hypselonotus fulvus*, *Leptoglossus gonagra*, *Leptoglossus zonatus*, *Sphictyrtus fasciatus* e *Zicca annulata*, pertencentes à família Coreidae e *Antiteuchus tripterus*, *Chlorocoris complanatus*, *Dichelops melacanthus*, *Edessa meditabunda*, *Euschistus heros*, *Loxa deducta*, *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus*, *Oebalus ypsilongriseus*, *Piezodorus guildinii*, *Platycarenus umbraculatus*, *Proxys albopunctulatus* e *Thyanta perditor* pertencentes à família Pentatomidae (Tabela 1), coletadas, na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil (20º 47' 13" S, 49° 21' 38" W) e fixadas em etanol absoluto. Para obtenção do DNA foram utilizados fragmentos da musculatura torácica utilizando o kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de amplificação foram 5′-CCGGTTTGAACTCAGATCATGT-3′ com 5′-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3′, para o gene 16S (SIMON et al., 1994) e 5′-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3′ com 5′-CTGAGATCCAACTACGAGCTT-3′ para o gene 18S (BARGUES; MAS-COMA, 1997). As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler em um volume total de reação de 10 μL, utilizando 100 ng de DNA; 0,2 mM de cada par de oligonucleotídeo; 100 mM de dNTP; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 a 3 mM de $MgCl_2$ e 0,5 unidades da DNA polimerase Platinum® (Invitrogen).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

As regiões gênicas amplificadas foram alinhadas com o programa ClustralW (THOMPSON et al., 1997). As sequências alinhadas foram posteriormente

ajustadas manualmente para minimizar os *gaps*. As bases que faltavam, isto é, bases ilegíveis devido a polimorfismos no DNA, estruturas secundárias ou limitações das enzimas de sequenciamento (SEIFERT; WINGFIELD; WINGFIELD, 1995) foram codificadas por pontos de interrogações (?) e os *gaps*, como pontos (.). As análises de composições nucleotídicas e das distâncias foram feitas com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Foram utilizadas as distâncias p, assumindo o número de diferenças entre os sítios, pelo total de sítios da sequência, e a distância baseada em Kimura 2-parâmetros por assumir as diferentes taxas entre transições e transversões (KIMURA, 1980).

Devido aos diferentes algorítimos para construções de árvores filogenéticas que podem assumir diferentes cenários evolutivos, as sequências alinhadas foram avaliadas pelo método de neighbor-joining, utilizando como distância Kimura 2-parâmetros, através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e inferência Bayesiana utilizando o programa MrBayes v3.2 (RONQUIST et al., 2012).

Resultados

Foram obtidas 12 sequências (uma de cada espécie) do gene mitocondrial 16S e 12 do nuclear 18S da família Coreidae e 13 sequências dos mesmos genes ribossomais da família Pentatomidae. As espécies amostradas estão descritas na Tabela 1. Estas sequências apresentaram, quando alinhadas, 531 e 543 sítios para o gene 16S nas famílias Coreidae e Pentatomidae, respectivamente e 611 e 614 sítios para o gene 18S para as famílias Coreidae e Pentatomidae, respectivamente (Tabela 2).

As sequências do gene 16S corresponderam à região formada pelos nucleotídeos 12.655 até o 13.127 do genoma mitocondrial de *Nezara viridula* (Pentatomidae - acesso: NC_011755) e aos nucleotídeos 12.539 a 13.004 de *Hydaropsis longirostris* (Coreidae - acesso: NC_012456). Com relação ao gene nuclear 18S, não há descrição em nenhuma espécie de Heteroptera e, por esta razão, a sequência parcial obtida foi comparada com a de *Drosophila willistoni* (acesso: NW_002032916), correspondendo à região que vai do nucleotídeo 571.066 a 571.672 do seu genoma nuclear.

Nestas sequências do gene 16S foram identificados 331 (62,33%) e 300 (55,25%) sítios conservados, respectivamente nas famílias Coreidae e Pentatomidae e 198 (37,29%) e 238 (43,83%) sítios variáveis (desconsiderando sítios com inserção de apenas um nucleotídeo). Foram identificados 76 (14,31%) e 87 (16,02%) sítios com apenas uma mutação, respectivamente nas famílias Coreidae e Pentatomidae. Nas sequências do gene 18S foram verificados 594 (97,22%) e 596 (97,10%) sítios conservados para, respectivamente, as famílias Coreidae e Pentatomidae, 17 (0,03%) e 15 (0,02%) variáveis, e 10 (0,02%) e 12 (0,02%) com apenas uma mutação (Tabela 2). No gene 16S foram constatadas, na composição nucleotídica, as frequências de nucleotídeos AT de 70,74% e 72,25% para, respectivamente, Coreidae e Pentatomidae. Por outro lado o gene 18S apresentou frequências de 50,12% e 49,76% de nucleotídeos AT, para as mesmas famílias (Tabela 2).

O gene 16S apresentou uma média de divergência baseada na distância "p" de 0,135 (0,006 a 0,172) e 0,164 (0,057 a 0,219), para as famílias Coreidae e Pentatomidae, respectivamente. Já no modelo Kimura 2-parâmetros, esse mesmo gene apresentou uma divergência de 0,150 (0,006 a 0,197) para a família Coreidae e 0,189 (0,059 a 0,259) para a Pentatomidae. Por sua vez, o gene 18S apresentou divergência, baseada na distância "p" de 0,008 (0 a 0,018) e 0,005 (0 a 0,020) para, respectivamente Coreidae e Pentatomidae, sendo que para a divergência baseada no modelo Kimura 2-parâmetros, foi obtido o mesmo resultado da distância p (Tabela 2).

Quando as sequências dos genes 16S e 18S foram concatenadas, obtiveram-se 1142 e 1157 sítios paras as famílias Coreidae e Pentatomidae, respectivamente, dos quais, 925 (81,00%) e 896 (77,44%) foram conservados, 215 (18,83%) e 253 (21,87%) foram variáveis, e 86 (7,53%) e 99 (8,56%) foram formados por mutação única (Tabela 2).

Estas sequências concatenadas apresentaram um conteúdo de bases AT de 59,62% e 60,10% para as famílias Coreidae e Pentatomidae, respectivamente. Ainda a divergência dessa sequência assumiu um valor médio para distância p de 0,066 (0,003 a 0,086, Coreidae) e 0,078 (0,031 a 0,102, Pentatomidae). Quando o modelo foi substituído pelo Kimura 2-parâmetros, verificou-se que os valores médios foram 0,070 (0,003 a 0,092, Coreidae) e 0,082 (0,032 a 0,109, Pentatomidae) (Tabela 2).

Com relação aos relacionamentos evolutivos, ao analisar como marcador o gene 16S, pelo método de neighbor-joining, para a família Coreidae, houve formação de agrupamentos parafiléticos para as tribos Anisoscelidini e Coreini. Na Anisoscelidini separou, por exemplo, as espécies do gênero *Leptoglossus*. A espécie *A. foliacea* agrupou com *A. bellator* da tribo Coreini. Apenas *C. guttula* e *H. fulvus* (Coreini) foram agrupadas (Figura 1a). Ao utilizar apenas o gene 18S como marcador, houve formação de agrupamentos parafiléticos para as tribos Anisoscelidini e Coreini. A espécie *A. foliacea* agrupou-se com *A. haematicus* da tribo Acanthocerini. No caso deste gene, as espécies do gênero *Leptoglossus* agruparam-se. Com relação à tribo Coreini as espécies *S. fasciatus* e *H. fulvus* agruparam-se com *C. armatus*, pertencente à tribo Chariesterini (Figura 1b). Ao concatenar ambos os genes, foi verificada parafilia nas tribos Anisoscelidini e Coreini, mas envolvendo apenas as espécies *A. foliacea*, *Z. annulata* e *A. bellator*, respectivamente (Figura 1c).

Nos cenários evolutivos mostrados pelo método de inferência Bayesiana houve parafilia para as tribos Anisoscelidini envolvendo as três espécies da tribo e Coreini que agrupou apenas as espécies *C. guttula* com *H. fulvus*, utilizando como marcador o gene 16S (Figura 2a). Com a utilização do marcador 18S houve formação de agrupamentos parafiléticos nas tribos Coreini, Anisoscelidini e Leptoscelini. Para a tribo Coreini, nenhuma espécie foi agrupada. O mesmo ocorreu com as três espécies da tribo Anisoscelidini. A tribo Leptoscelini formou agrupamento parafilético por incluir a espécie *L. gonagra* (Figura 2b). Quando ambos os marcadores foram analisados em conjunto, foi verificado que as espécies do gênero *Leptoglossus* não estão no mesmo ramo e as espécies da tribo Coreini estavam separadas, exceto pelo agrupamento formado pelas espécies *S. fasciatus*, *C. guttula* e *H. fulvus* (Figura 2c).

Os cenários evolutivos mostrados, utilizando o marcador 16S pelo método de neighbor-joining para a família Pentatomidae, revelam parafilia entre as tribos Carpocorini, na qual a espécie *D. melacanthus* encontra-se fora do agrupamento, Pentatomini, cuja espécie *P. albopunctulatus* encontra-se separada de *T. perditor*, Chlorocorini na qual as espécies *C. complanatus* e *L. deducta* foram separadas e na tribo Discocephalini, onde houve a inclusão de *E. meditabunda* e *C. complanatus* no agrupamento formado dessa tribo (Figura 3a). Com a utilização do marcador nuclear 18S, ocorreu a formação de agrupamentos parafiléticos envolvendo apenas a tribo

Pentatomini, cuja espécie *P. guildinii*, da tribo Piezodorini, estava incluída (Figura 3b). Quando ambos os marcadores foram concatenados, ocorreu a formação de agrupamentos parafiléticos nas tribos Carpocorini, cuja espécie *D. melacanthus* encontrou-se separada de sua tribo, Pentatomini, separando ambas as espécies dessa tribo. Da mesma forma ocorreu com as espécies das tribos Discocephalini e Chlorocorini (Figura 3c).

Nos cenários evolutivos mostrados pelo método de inferência Bayesiana utilizando como marcador o gene 16S, na família Pentatomidae houve formação de agrupamentos parafilético para as tribos Carpocorini, onde a espécie *D. melacanthus* não estava incluída, Chlorocorini, Discocephalini e Pentatomini cujas espécies não agruparam ou formaram agrupamentos com espécies de outras tribos (Figura 4a). O mesmo ocorreu ao utilizar o marcador 18S (Figura 4b). Ao concatenar ambos s genes, a monofila das tribos não foi recuperada (Figura 4c).

Todos os cenários evolutivos gerados apresentaram, de forma geral, baixas consistências entre os ramos, evidenciados pelos bootstraps pelo método de neighbor-joining e probabilidades à priori pelo método de inferência Bayesiana.

Discussão

A pequena subunidade nuclear ribosomal 18S (18S rDNA), além de ser útil para inferências em táxons menos inclusivos, fornece sequências que são obtidas rapidamente e são fáceis para desenhar oligonucleotídeos iniciadores (WOESE, 1987; KJER, 1995). Alguns estudos têm utilizado, com sucesso, a sequência parcial ou completa desse gene para analisar relações evolutivas entre as linhagens mais inclusivas de Hemiptera (WHEELER et al., 1993; CAMPBELL et al., 1995; SORENSEN et al., 1995).

Em nossas análises, estudando fragmentos do gene 18S das espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, foram obtidos, respectivamente, 611 sítios e 614 sítios, com cerca de 97% conservados. Esse nível de conservação do gene possibilitou inferir análises com apenas 17 sítios variáveis em Coreidae e 15 em Pentatomidae. Tal aspecto pode deixar as relações filogenéticas não resolvidas. Contudo esses poucos

sítios variados podem se tornar significativos quando utilizados em conjunto com outros genes.

Já o gene ribosomal 16S tem sido utilizado para relações filogenéticas em diversos níveis taxonômicos de invertebrados (SIMON et al., 1994). Contudo, devido ao seu baixo nível de divergência, esse gene pode falhar ao analisar as relações taxonômicas para gênero, mas pode ser muito útil para relações taxonômicas de taxas mais distantes, como famílias (MURAJI et al., 2000). Nas famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) o fragmento desse gene apresentou respectivamente 531 e 543 sítios, das quais 62,33% e 55,25% eram conservados para ambas as famílias. Desse modo, tal fragmento apresentou 198 e 238 sítios variáveis, evidenciando, desse modo, uma variabilidade maior em comparação ao 18S. Isso possibilitaria a utilização de um número maior de sítios nas análises e, consequentemente, poderia levar a um maior número de ramos resolvidos. Porém isso não ocorreu quando foram comparadas as filogenias dos genes 16S e 18S, como será discutido posteriormente neste texto.

Com relação à porcentagem de nucleotídeos adenina e timina, em muitos insetos holometábolos, incluindo Hymenoptera e *Drosophila*, o mtDNA apresenta uma composição de nucleotídeos que é rica nesses nucleotídeos (WHITFIELD et al., 1998).

No presente trabalho o gene 16S evidenciou aproximadamente 70% de nucleotídeos AT, para ambas as famílias, enquanto que no gene 18S foi observado 50%. Ambas as taxas de transição e transversão são comparáveis às de outros grupos de insetos reportados na literatura, como em cigarrinhas (FANG et al., 1993), moscas da família Simuliidae (Diptera) (XIONG; KOCHER, 1991) e baratas (KAMBHAMPATI, 1995). A análise dos genes em conjunto nos mostraram por volta de 60% de frequência dos nucleotídeos AT.

Com relação à distância evolutiva dos genes, foi verificado que o fragmento do 16S apresentou uma divergência média maior que o 18S para ambas as análises, distância p e k2p nas duas famílias amostradas. Vale ressaltar que não houve diferença entre as médias das distâncias quando se analisou o gene 18S.

Sozinhos, ambos os marcadores formaram agrupamentos parafiléticos. É interessante observar que, embora o gene 18S, tenha apresentado poucos sítios analisáveis, estes formaram cenários evolutivos com menos parafilias envolvendo as tribos, como foi o caso do cenário evolutivo evidenciado pelo método de análise

Bayesiana na família Pentatomidae, mostrando apenas Pentatomini como tribo parafilética. Quando as sequências de nucleotídeos de ambos os marcadores foram concatenadas, houve diminuição da parafilia entre as tribos, como ocorreu, utilizando ambos os métodos, na família Coreidae, mostrando que as informações dos dois marcadores somaram-se, deixando as análises mais confiáveis. Já, para a família Pentatomidae foi observado o oposto.

Pode-se constatar, nas filogenias geradas, baixa consistência entre os ramos formados, dificultando uma inferência evolutiva mais robusta nos cenários evolutivos observados.

Desse modo, ambos os genes podem auxiliar na busca por inferências evolutivas nas famílias de Heteroptera apresentadas, em especial, o gene 18S, que poderá ainda resolver filogenias de taxons mais inclusivos em Heteroptera. Contudo, a inclusão de outros marcadores deve ser feita, a fim de promover a formação de um cenário evolutivo mais robusto. Evidências de outros genes são claramente necessárias para resolver de forma inequívoca relações entre as famílias de Heteroptera.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Jocélia Grazia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Profa. Dra. Aline Barcellos do Museu de Ciências Naturais de Porto Alegre, Brasil, que nos auxiliou na identificação das espécies. À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros.

Referências Bibliográficas

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 569–577, 1997.

BRESSA, M. J.; PAPESCHI, A. G., MOLA, L.; LARRAMENDY, M .L. Autossomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* and *Jadera sanguinolenta* (Heteroptera: Rhopalidae: Serinethinae). **European Journal of Entomology**, v. 98, p. 151-157, 2001.

CAMPBELL, B. C.; STEVEN-CAMPBELL, J. D.; SORENSEN, J. T.; GILL, R. J. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequence. **Syst. Entomol.**, v. 20, p. 175–194, 1995.

FANG, Q.; BLACK, W. C.; BLOCKER, D.; WHITCOMB, R. F. A phylogeny of New World Deltocephalus-like leafhopper genera based on mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 2, p. 119-131, 1993.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quart. Rev. Biol.**, v. 66, p. 411–453, 1991.

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

KAMBHAMPATI S. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 92, p. 2017–2020, 1995.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KJER, K. M. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. **Mol. Phylogenet. Evol**. v. 4, p. 314–330, 1995.

MURAJI M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial *COI* fragment in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, p. 301-307, 2000.

RONQUIST F.; TESLENKO M.; VAN DER MARK P.; AYRES D.L.; DARLING A.; HÖHNA S.; LARGET B.; LIU L.; SUCHARD M.A.; HUELSENBECK J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v.61, p. 539-542, 2012.

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

SEIFERT, K. A.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D. A critique of DNA sequence analyses in fungal taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, S760-S767, 1995.

SIMON C.; FRATI F.; BECKENBACH A.; CRESPI B.; LIU H.; FLOOK P.; Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n.6, p. 651-701, 1994.

SORENSEN, J. T.; CAMPBELL, B. C.; GILL, R. J.; STEVEN-CAMPBELL, J. D.; Non-monophyly of Aucnehorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: Eco-evolutionary and cladistic implications within pre-Heteropterodea

Hemiptera (s. l.) and a proposal for new monophyletic suborders. **Pan-Pac. Entomol.**, v. 73, p. 31–60, 1995.

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

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v.104, p.353-262, 2007b.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA M. M. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2010, 10 pp, 2010.

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

THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGUNS, D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4881, 1997.

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

WHITFIELD, J. B.; CAMERON, S. A. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. **Mol. Biol. Evol.** v. 15, p. 1728–1743, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 221–271, 1987.

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

Tabela 1. Classificação das espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae utilizadas para as análises dos genes ribossomais mitocondrial 16S e nuclear 18S.

Família	**Subfamília**	**Tribo**	**Espécie**	**N. de Acesso 16S**	**N. de Acesso 18S**
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	*Anisoscelis foliacea*	KC537009	KC537034
			Leptoglossus gonagra	KC537016	KC537041
			Leptoglossus zonatus	KC537017	KC537042
		Acanthocerini	*Athaumastus haematicus*	KC537010	KC537035
		Chariesterini	*Chariesterus armatus*	KC537012	KC537037
		Coreini	*Anasa bellator*	KC537008	KC537033
			Catorhintha guttula	KC537011	KC537036
			Hypselonotus fulvus	KC537015	KC537040
			Sphictyrtus fasciatus	KC537018	KC537043
			Zicca annulata	KC537019	KC537044
		Leptoscelini	*Dallacoris obscura*	KC537013	KC537038
			Dallacoris pictus	KC537014	KC537039
Pentatomidae	Discocephalinae	Discocephalini	*Antiteuchus tripterus*	KC537020	KC537045
			Platycarenus umbraculatus	KC537030	KC537055
	Edesinae	Edessini	*Edessa meditabunda*	KC537023	KC537048
	Pentatominae	Carpocorini	*Dichelops melacanthus*	KC537022	KC537047
			Euschistus heros	KC537024	KC537049
			Mormidea v-luteum	KC537026	KC537051
			Oebalus ypsilongriseus	KC537028	KC537053
			Oebalus poecilus	KC537027	KC537052
		Chlorocorini	*Chlorocoris complanatus*	KC537021	KC537046
			Loxa deducta	KC537025	KC537050
		Pentatomini	*Proxys albopunctulatus*	KC537031	KC537056
			Thyanta perditor	KC537032	KC537057
		Piezodorini	*Piezodorus guildinii*	KC537029	KC537054

Tabela 2. Estatística descritiva das sequências dos genes ribossomais mitocondrial 16S e nuclear 18S para as famílias Coreidae e Pentatomidae.

	16S		18S		16S + 18S	
Composição Nucleotídica	**Coreidae**	**Pentatomidae**	**Coreidae**	**Pentatomidae**	**Coreidae**	**Pentatomidae**
Comprimento (sítios)	531	543	611	614	1142	1157
N. sítios conservados	331 (62,33%)	300 (55,25%)	594 (97,22%)	596 (97,10%)	925 (81,00%)	896 (77,44%)
N. sítios variáveis	198 (37,29%)	238 (43,83%)	17 (0,03%)	15 (0,02%)	215 (18,83%)	253 (21,87%)
N. sítios únicos	76 (14,31%)	87 (16,02%)	10 (0,02%)	12 (0,02%)	86 (7,53%)	99 (8,56%)
%A	41,08%	41,92%	28,02%	28,07%	34,04%	34,44%
%T	29,65%	30,33%	22,10%	21,69%	25,58%	25,66%
%C	18,22%	17,79%	24,38%	24,76%	21,54%	21,55%
%G	11,04%	9,96%	25,50%	25,49%	18,84%	18,35%
%AT	70,74%	72,25%	50,12%	49,76%	59,62%	60,10%
%CG	29,26%	27,75%	49,88%	50,24%	40,38%	39,90%
Divergências						
Distância p						
Média	0,135	0,164	0,008	0,005	0,066	0,078
Min-Max	0,006-0,172	0,057-0,219	0-0,018	0-0,020	0,003-0,086	0,031-0,102
Kimura 2-Parâmetros						
Média	0,150	0,189	0,008	0,005	0,070	0,082
Min-Max	0,006-0,197	0,059-0,259	0-0,018	0-0,020	0,003-0,092	0,032-0,109

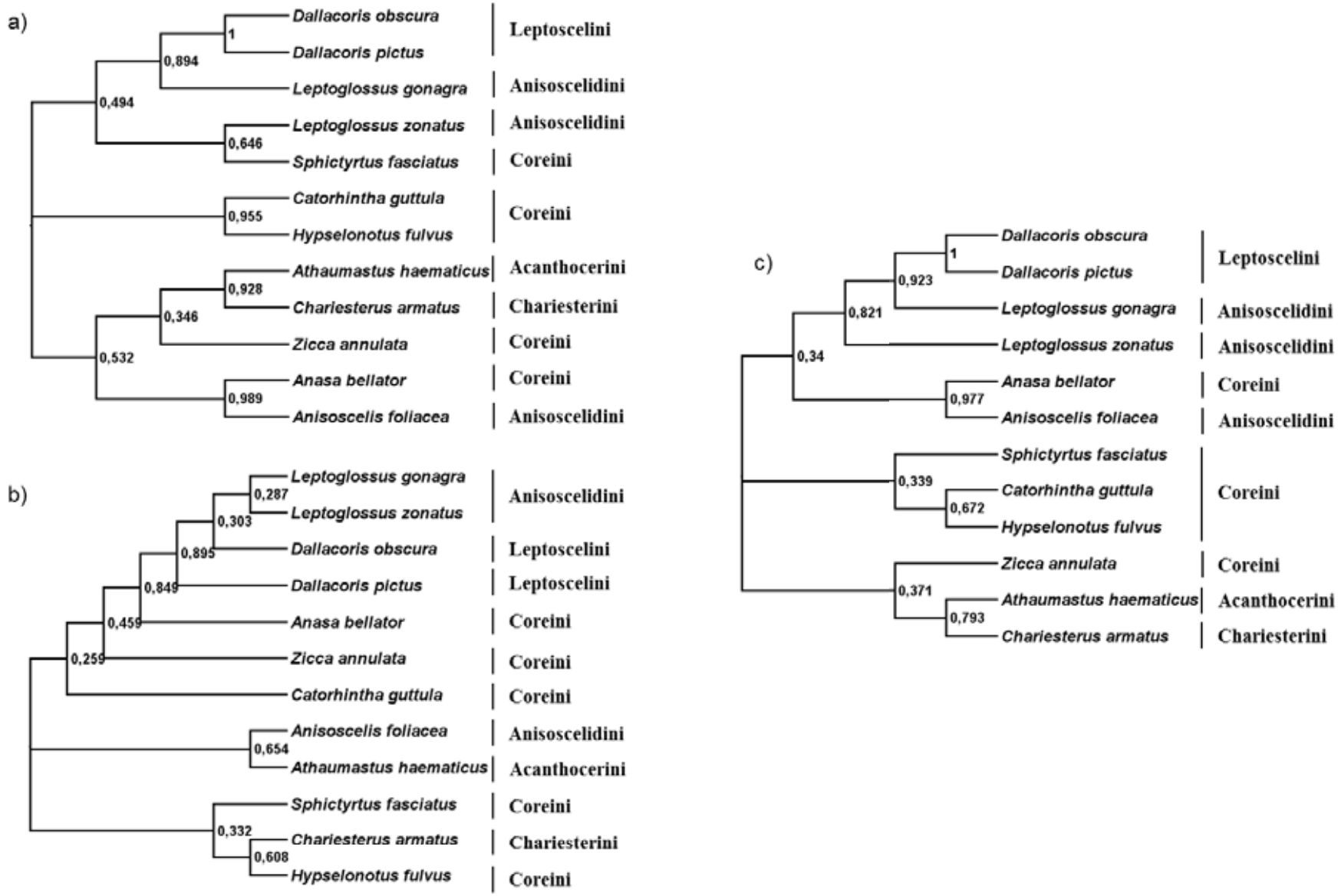

Figura 1. Relacionamentos filogenéticos obtidos pelo método de neigbor-joining das espécies da família Coreidae utilizando como marcadores moleculares: a) o gene mitocondrial ribossomal 16S; b) o gene nuclear ribossomal 18S e; c) ambos os genes concatenados. As árvores obtidas não estão enraizadas.

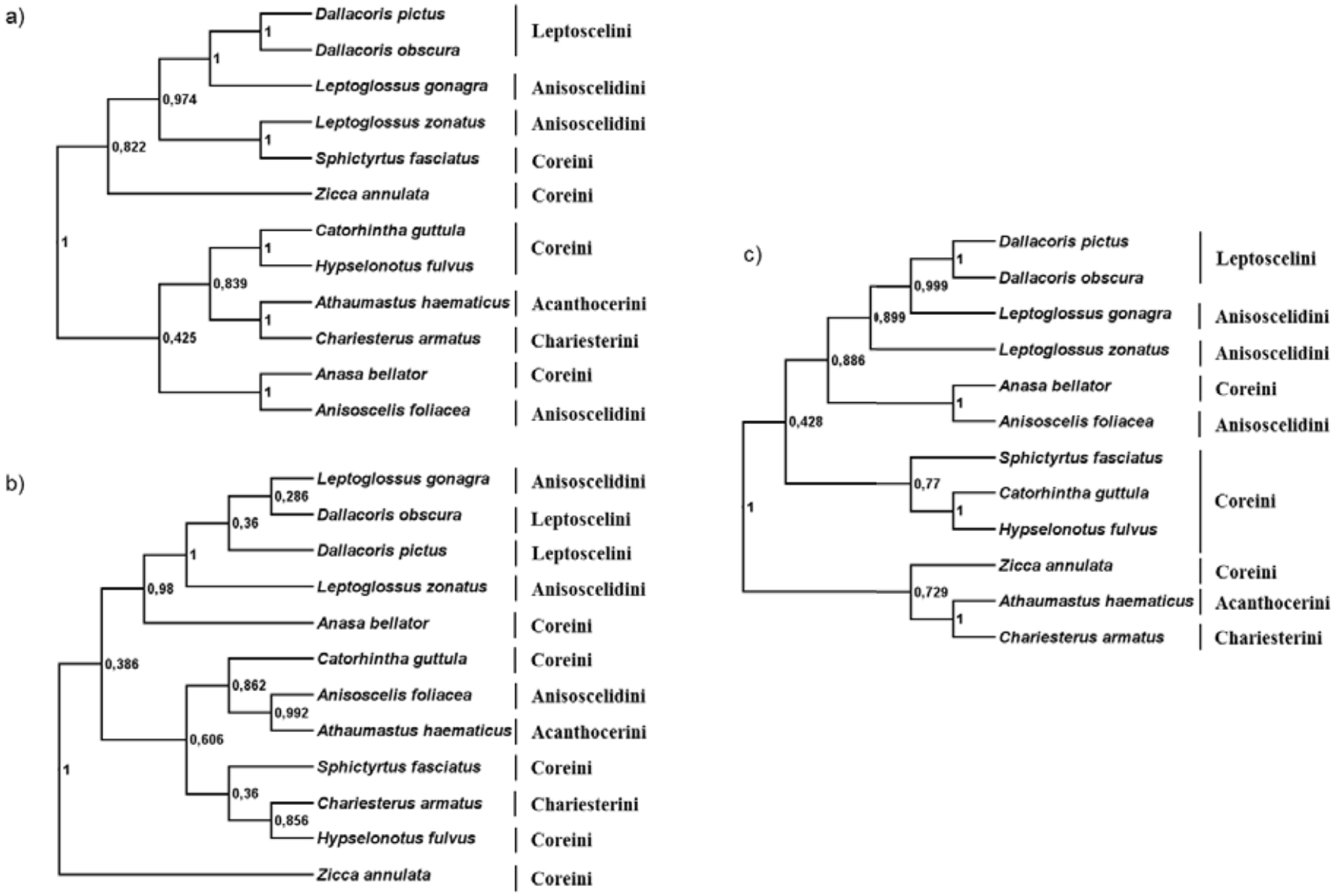

Figura 2. Relacionamentos filogenéticos obtidos pelo método de inferência bayesiana das espécies da família Coreidae utilizando como marcadores moleculares: a) o gene mitocondrial ribossomal 16S; b) o gene nuclear ribossomal 18S e; c) ambos os genes concatenados. As árvores obtidas não estão enraizadas.

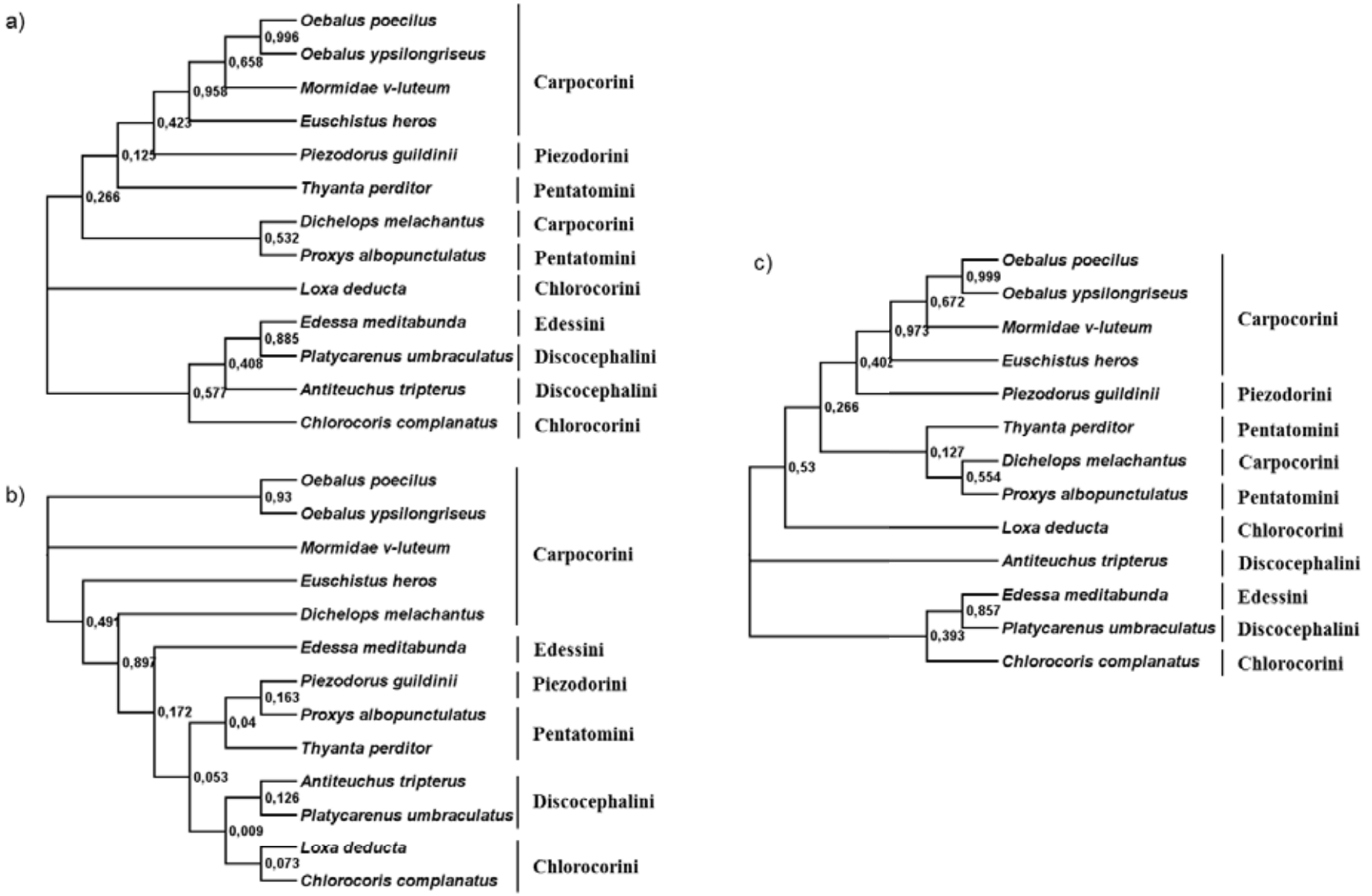

Figura 3. Relacionamentos filogenéticos obtidos pelo método de neigbor-joining das espécies da família Pentatomidae utilizando como marcadores moleculares: a) o gene mitocondrial ribossomal 16S; b) o gene nuclear ribossomal 18S e; c) ambos os genes concatenados. As árvores obtidas não estão enraizadas.

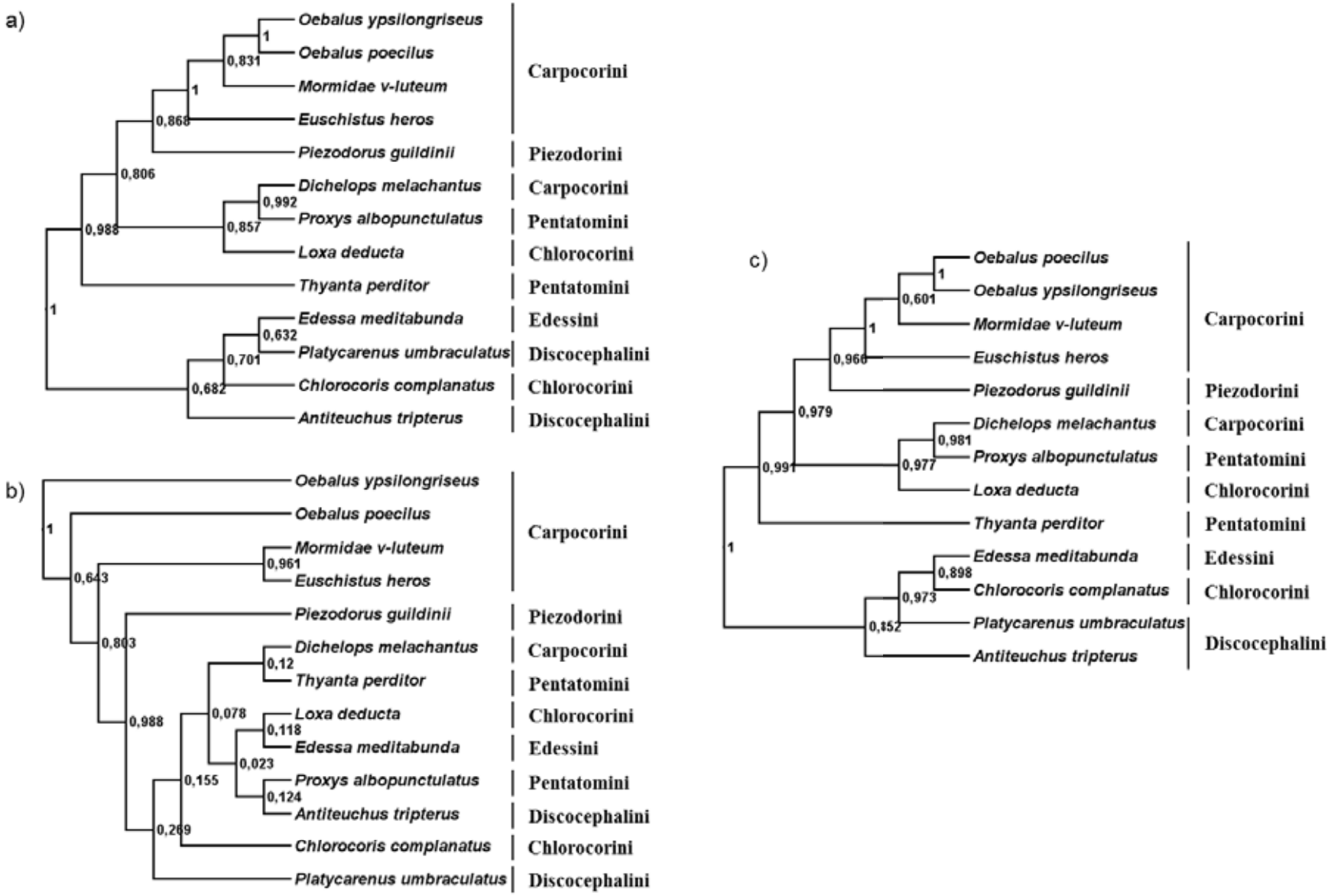

Figura 4. Relacionamentos filogenéticos obtidos pelo método de inferência bayesiana das espécies da família Pentatomidae utilizando como marcadores moleculares: a) o gene mitocondrial ribossomal 16S; b) o gene nuclear ribossomal 18S e; c) ambos os genes concatenados. As árvores obtidas não estão enraizadas.

V. CAPITULO 3

Análise evolutiva dos lobos testiculares e aspectos citogenéticos baseada nos genes *COI*, 16S e 18S da família Coreidae (Heteroptera)

Hederson Vinicius de SOUZA[1], Cecília Ártico BANHO[1]; Sandra Regina de Carvalho MARCHESIN[2], Mary Massumi ITOYAMA[1†].

[1]UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]UNIP - Universidade Paulista, Campus Juscelino Kubitschek, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
[†]mary@ibilce.unesp.br

Palavras-chave: Cariótipo, Lobo testicular, Complemento Cromossômico, Coreidae.

Resumo

Além da diversidade de insetos descritos, os Heteroptera apresentam certas particularidades, como colorações diferentes da bainha peritoneal e números variáveis de lobos testiculares. Somado a essas características, os Heteroptera possuem cromossomos holocinéticos, que podem levar a diversidade cariotípica. Embora apresentem inúmeras características peculiares, como as tratadas anteriormente, a evolução dessas características é pouco explorada. Assim, o presente trabalho propôs investigar o cenário evolutivo de espécies da família Coreidae e inferir a evolução dos caracteres número de lobos, pigmentação da bainha peritoneal e cariótipo, baseando-se na análise evolutiva dos genes *COI*, 16S e 18S. Desse modo, foi verificado que a pigmentação da bainha peritoneal, não é homogênea, contudo a pigmentação avermelhada é evidenciada nas espécies derivadas. As alterações cromossômicas numéricas não mostram um padrão evolutivo definido. Desse modo, este trabalho evidenciou a complexidade das distribuições das características testiculares e citogenéticas relatadas através da filogenia molecular.

Introdução

Heteroptera é o maior e mais diversificado grupo de insetos com metamorfose incompleta. Eles são tratados como uma subordem dos Hemiptera. Compreende cerca de 75 famílias, a maioria das quais pode ser encontrada em quase todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas. A sua longa história evolutiva e aparente adaptabilidade resultaram em uma grande diversidade biológica e estrutural (SCHUH; SLATER, 1995).

Os Heteroptera possuem testículos formados por compartimentos denominados lobos testiculares, apresentando números variados e pigmentação da bainha peritoneal diversificada. É o caso da família Coreidae que pode possuir até sete lobos testiculares envolvidos por uma bainha peritoneal com variações na pigmentação, sendo conhecidas, até o momento as tonalidades avermelhada, alaranjada, amarelada e translúcida (SOUZA et al., 2007).

Os resultados dos estudos citogenéticos até agora relatados na literatura mostram que os Heteroptera são caracterizados por possuírem cromossomos holocêntricos, não apresentarem estrutura cinetocórica nas células meióticas (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO, RUTHMANN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996) e terem atividade cinética restrita às extremidades dos cromossomos (MOTZKO; RUTHMANN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

De acordo com Jacobs (2004), como todos os Heteroptera apresentam cromossomos holocêntricos, fragmentos que se originam devido a quebras cromossômicas, geralmente movem-se regularmente para os polos durante a anáfase e sobrevivem por muitas gerações celulares. Fragmentação pode, portanto, levar facilmente ao aumento do número cromossômico. Da mesma maneira, fusão cromossômica é, também, teoricamente mais fácil de ocorrer em organismos com cromossomos holocêntricos, pois não ocorrem problemas associados com a formação de cromossomos dicêntricos.

Souza et al. (2007) analisaram as espécies *Anasa bellator, Athaumastus haematicus, Chariesterus armatus, Dallacoris obscura, Dallacoris pictus, Leptoglossus gonagra, Leptoglossus zonatus, Sphictyrtus fasciatus* e *Zicca annulata* (Coreidae,

Heteroptera) e verificaram que elas possuem sistema cromossômico do sexo X0, um par de m-cromossomos, primeira divisão meiótica reducional e segunda equacional para os autossomos e o inverso para os cromossomos sexuais e quiasmas intersticiais na maioria dos autossomos. O número de cromossomos das espécies analisadas variou de 19 (16A + 2m + X0) a 25 (22A + 2m + X0), mostrando essa diversidade de cariótipos dentro da mesma família, contudo não foi estabelecido um cenário evolutivo para essa característica nos Coreidae e de modo geral em Heteroptera.

Dada a importância dos Heteroptera, o presente trabalho propôs-se a investigar o cenário evolutivo de 12 espécies da família Coreidae e inferir a evolução dos caracteres números de lobos, pigmentação da bainha peritoneal e cariótipo, baseando-se na análise evolutiva dos genes *COI*, 16S e 18S.

Material e Métodos

Foram analisadas as espécies: *Anasa bellator*, *Anisoscelis foliacea*, *Athaumastus haematicus*, *Catorhintha guttula*, *Chariesterus armatus*, *Dallacoris obscura*, *Dallacoris pictus*, *Hypselonotus fulvus*, *Leptoglossus gonagra*, *Leptoglossus zonatus*, *Sphictyrtus fasciatus* e *Zicca annulata*, pertencentes à família Coreidae (Tabela 1), coletadas, na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil (20º 47' 13" S, 49° 21' 38" W) e fixadas em etanol absoluto. Para obtenção do DNA foram utilizados fragmentos da musculatura torácica dos espécimes coletados utilizando o kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

Os oligonucleotídeos inicializadores utilizados para as reações de amplificação foram os 5′-CCGGTTTGAACTCAGATCATGT-3′ com 5′-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3′ para o gene 16S (SIMON et al., 1994) e 5′-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3′ com 5′-CTGAGATCCAACTACGAGCTT-3′ para o gene 18S (BARGUES, MAS-COMA, 1997), 5'-TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' com 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3 para região inicial do *COI* (FOLMER et al., 1994) e 5'-AGCAGGAATTTCATCAATTTT-3' com 5'-CTGTAAATATGTGATGTGCTC-3' para região mediana do *COI* (MURAJI, et al., 2000). Tais amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler em um volume total de reação de 10 μL, utilizando 100 ng de DNA; 0,2 mM de cada par de oligonucleotídeo; 100 mM de dNTP; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 a 3 mM de

$MgCl_2$ e 0,5 unidades da DNA polimerase Platinum® (Invitrogen).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

As regiões gênicas amplificadas foram alinhadas com o programa ClustralW (THOMPSON et al., 1997). As análises de Composição Nucleotídicas e das distâncias foram feitas com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Foram utilizadas as distâncias p, assumindo o número de diferenças entre os sítios, pelo total de sítios da sequência e a distância baseada em Kimura 2-parâmetros por assumir as diferentes taxas entre transições e transversões (KIMURA, 1980).

Para determinar se existe incongruência significativa entre as sequências dos fragmentos dos genes analisados no presente trabalho, foi feito o teste de diferença de incongruência pelo tamanho (ILD) pelo programa PAUP*4.0b10 com 100 interações.

Foram utilizadas as espécies *Dichelops melacanthus*, *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus* e *Piezodorus guildinii* da família Pentatomidae para representar o grupo externo. Essa escolha foi feita a partir da análise evolutiva da ordem Pentatomomorpha obtida por Li et al. (2005) e por essas espécies já possuírem todas as informações necessárias para as análises deste trabalho.

Para a formação do cenário evolutivo, foi utilizado o método de neighbor-joining através do modelo de Kimura 2-Parâmetros (K2P) e máxima verossimilhança com o modelo General Time Reversible (GTR) através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). O cenário evolutivo feito pelo método de inferência Bayesiana foi obtido através do programam MrBayes v3.2 (RONQUIST et al. 2012).

Resultados

Foram obtidas 12 sequências (uma de cada espécie) dos genes *COI* - região 1 e 2, 16S e 18S da família Coreidae. As espécies amostradas estão descritas na Tabela 1. O teste de homogeneidade da partição (ILD) nas partições formadas pelos fragmentos dos genes *COI*, 16S e 18S teve como resultado p= 1.00, o qual indica que há evidências insuficientes para rejeitar a hipótese de incongruência. Por isso, tais fragmentos puderam ser combinados e, assim, formaram 2273 sítios (três genes) dos

quais, 1642 eram sítios conservados e 629 sítios variáveis e 181 sítios únicos (Tabela 2). Essa sequência concatenada apresentou 62,73% de seus nucleotídeos de Timina e Adenina, sendo constatada uma taxa de transição/transversão (Si/Sv) de 1,00 (Tabela 2). Na análise de distância foi verificada uma média de 0,115, variando de 0,003 a 0,137 para a distância p e 0,126, variando de 0,003 a 0,152 para a distância Kimura 2-parâmetros (Tabela 2).

Os cenários evolutivos obtidos pelos métodos de neighbor-joining, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana demonstraram que a espécie *Z. annulata* é a espécie basal entre as espécies estudadas. Já as espécies dos gêneros *Dallacoris* e *Leptoglossus* foram as mais derivadas (Figuras 1 a 4).

O cenário evolutivo obtido pelo método de neighbor-joining, com os dados concatenados *COI*, 16S e 18S, apresentou apenas dois ramos monofiléticos, envolvendo as tribos Carpocorini (Pentatomidae - grupo externo) e Leptoscelini, composto pelo gênero *Dallacoris*. Embora o agrupamento da tribo Coreini seja parafilético, houve a formação de um ramo envolvendo duas espécies, *C. guttula* e *H. fulvus* (Figura 1a). Quando se verifica o cenário evolutivo por inferência Bayesiana é possível verificar a presença dos mesmos ramos monofiléticos, contudo para o agrupamento da tribo Coreini observa-se um ramo formado por três espécies (*C. guttula*, *H. fulvus* e *S. fasciatus*) (Figura 1b). O cenário evolutivo obtido pelo método da máxima verossimilhança foi o mesmo obtido pelo método de Inferência Bayesiana (Figura 1c).

Por apresentar as mesmas relações evolutivas nos métodos de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, esta topologia foi utilizada para analisar a evolução das características número de lobos, pigmentação da bainha peritoneal e cariótipo, descritos na Tabela 3.

Quando se analisa a pigmentação da bainha peritoneal observa-se que a pigmentação avermelhada ocorre no agrupamento envolvendo os gêneros *Dallacoris* e *Leptoglossus*, além do agrupamento formado pelas espécies do grupo externo. As outras espécies como *A. bellator*, *A. haematicus* e *S. fasciatus* não formam um agrupamento envolvendo essa mesma característica. *C. guttula* e *H. fulvus* formam um ramo com a característica pigmentação alaranjada, contudo *Anisoscelis foliacea* não compartilha o mesmo ancestral comum que envolve as espécies desse ramo. As espécies *C. armatus* e

Z. annulata apresentaram características não compartilhadas, respectivamente bainha peritoneal translucida e amarelada (Figura 2).

Assim, com relação aos números dos lobos testiculares, a família Coreidae apresenta sete lobos testiculares para todas as espécies, exceto para *C. armatus* e *Z. annulata*, que apresentaram quatro lobos. Nas espécies do grupo externo foram observados seis lobos testiculares para *D. melacanthus* e *P. guildinii* e três para *M. v-luteum* e *O. poecilus* (Figura 3).

Quando o cenário evolutivo envolveu a característica complemento cromossômico pode-se notar que as espécies do gênero *Dallacoris* e *Leptoglossus* apresentam o complemento 2n= 21 (18A+2m+X0), contudo as espécies *A. bellator* e *A. haematicus* não fazem parte desse ramo. Da mesma forma as *C. armatus* e *C. guttula*, 2n= 25 (22A+2m+X0), e *S. fasciatus* e *H. fulvus*, 2n= 19 (16A+2m+X0), não apresentaram um ancestral comum que compartilhasse da mesma característica. As espécies *A. foliacea*, 2n= 27 (24A+2m+X0), e *Z. annulata*, 2n= 23 (20A+2m+X0) não apresentaram suas características compartilhadas com as demais espécies. As espécies do grupo externo apresentaram 2n= 14 (12A+XY), exceto pela espécie *D. melacanthus* que possuiu 2n= 12 (10A+XY) (Figura 4).

Discussão

A evolução das espécies de Heteroptera da família Coreidae fazendo uso de dados moleculares, ainda é pouco explorada na literatura, sendo muitas vezes analisada dentro da subordem Pentatomomorpha, como nos trabalhos de Li et al. (2005). Neste estudo, cenários evolutivos das espécies da família Coreidae foram analisados através de dados moleculares dos genes *COI*, 16S e 18S. Essas análises mostraram-se concordantes na maioria dos ramos obtidos pelos diferentes métodos, neighbor-joining, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana e, por isso, a inferência evolutiva de caracteres, através dessas topologias geradas, foi facilitada.

Uma dessas características, ainda pouco explorada em Heteroptera é a investigação da pigmentação da bainha peritoneal que envolve os lobos testiculares. Souza et al. (unpublished) observaram variedades de colorações dessa bainha nas famílias Coreidae e Pentatomidae, sendo encontrados pigmentos que conferem a ela as

colorações avermelhadas, amareladas e sem pigmentação aparente. Neste trabalho foi verificado que na família Coreidae há prevalência da bainha peritoneal com pigmentação avermelhada que está presente nas espécies derivadas, como nas tribos Leptoscelini e Anisoscelidini, podendo também ser encontrado as membranas com pigmentos alaranjados e amarelados. A pigmentação amarelada, por exemplo, é encontrada na espécie *Z. annulata*, que no cenário evolutivo obtido, foi considerada espécie basal. A membrana peritoneal não pigmentada ocorre em *C. armatus*, que faz parte do mesmo ramo que a espécie *A. haematicus*, espécie que possui pigmentação avermelhada. As espécies *C. guttula* e *H. fulvus* apresentaram pigmentação amarelada e estão presentes no mesmo ramo, contudo a espécie *A. foliacea*, que também apresenta pigmentação amarelada, não faz parte do mesmo ramo. As espécies do grupo externo apresentaram a bainha peritoneal com pigmentos avermelhados, sendo, essa característica, considerada ancestral. Assim, nota-se nos Coreidae que em algumas espécies podem ter perdido a pigmentação em sua bainha, como *C. armatus*, enquanto outras a mantiveram deixando a bainha peritoneal com a tonalidade avermelhada. Desse modo, o presente trabalho mostra a necessidade de exploração dessa característica.

Outra característica peculiar em Heteroptera são os testículos divididos por um tecido conectivo em subunidades denominadas lobos. O número mais comum é sete, embora haja variações entre tribos e espécies (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005). Na família Coreidae, por exemplo, o número modal é sete. No presente trabalho, o cenário evolutivo desse caráter, contudo, foi controverso. A espécie *Z. annulata* foi considerada basal e apresentou apenas quatro lobos testiculares. Os representantes do grupo externo apresentaram seis lobos testiculares, contudo alguns membros dessa família foram reportados apresentando sete lobos testiculares, como *P. umbraculatus*, *C. complanatus* e *L. deducta* (SOUZA; ITOYAMA, 2011; SOUZA et al., 2011). Dessa maneira, pode-se supor que sete lobos testiculares seja o caráter ancestral e que perdas desses lobos podem ter ocorrido durante a evolução das espécies, contudo é interessante observar que forças evolutivas podem atuar para a manutenção desse caráter, visto que é mantido nas espécies derivadas.

Com relação à análise cariotípica, nas espécies de Coreidae analisadas por Souza et al. (2007) foi evidenciado que o número de cromossomos variou de 19 (16A + 2m + X0) a 25 (22A + 2m + X0) cromossomos. No presente trabalho, as

espécies derivadas apresentaram o cariótipo 2n= 21 (18A+2m+X0), como as espécies dos gêneros *Dallacoris* e *Leptoglossus*, enquanto que *Z. annulata*, considerada basal apresentou 2n= 23 (20A+2m+X0). Embora as espécies *A. bellator* e *A. haematicus* apresentassem 2n= 21 (18A+2m+X0), elas não compartilharam o mesmo ancestral. As espécies *A. foliacea* e *C. armatus*, com 2n= 27 (24A+2m+X0), também não foram agrupadas no mesmo ramo. As espécies do grupo externo apresentaram 2n=16 (14A+XY); contudo, na família Pentatomidae, os complementos cromossômicos são mais conservados, sendo mais frequente o de 2n= 14 (85%) (REBAGLIATI et al., 2005). A exceção destas espécies é *D. melacanthus* (Pentatomidae) que apresentou 10A+XY. Souza et al. (2011) estudaram o complemento cromossômico dessa espécie e sugeriram que houve uma fusão recente de dois autossomos, formando um cromossomo maior. Neste contexto não foi possível inferir a origem da variabilidade do complemento cromossômico, sendo considerado que fusões e fissões podem ocorrer igualmente, quando as pressões seletivas para esse caráter estão atuando com menor intensidade.

Com esse trabalho foi possível verificar a complexidade das distribuições das características testiculares e citogenéticas entre os Heteroptera, em especial, da família Coreidae, sendo necessário aprofundar os estudos evolutivos das espécies dessa família com novas abordagens para elucidar a evolução desses caracteres.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Jocélia Grazia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Profa. Dra. Aline Barcellos do Museu de Ciências Naturais de Porto Alegre, Brasil, que nos auxiliou na identificação das espécies. À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros.

Referências Bibliográficas

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA Sequences**. Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 569–577, 1997.

BUCK, R. C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus:* the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

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.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol**. v. 3, p. 294-297, 1994.

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.

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

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LI H. M.; DENG R. Q.; WANG J. W.; CHEN Z. Y.; JIA F. L., WANG X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 2, p. 313-326, 2005.

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

MURAJI, M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial *COI* fragment in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, p. 301-307, 2000.

NICKLAS, R. B. The relationship between DNA content and alternative meiotic patterns in certain Discocephalinids (Pentatomidae; Heteroptera). **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 2, p. 486–490, 1961.

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

RONQUIST F.; TESLENKO M.; VAN DER MARK P.; AYRES D.L.; DARLING A.; HÖHNA S.; LARGET B.; LIU L.; SUCHARD M.A.; HUELSENBECK J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

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

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

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

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

SIMON, C.; FRATI F.; BECKENBACH A.; CRESPI B.; LIU H.; FLOOK P.; Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n.6, p. 651-701, 1994.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M.Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of heteropyknotic chromatin and silver-stained material in *Platycarenus umbractulatus* (Pentatomidae: Discocephalinae). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 55, p. 65-72, 2011.

SOUZA, H. V.; MURAKAMI, A. S.; MOURA, J; ALMEIDA, E. C.; MARQUES, I. F. G.; ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, p. 333-345, 2011.

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

THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGUNS, D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4881, 1997.

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

Tabela 1. Classificação das espécies analisadas obtidas a partir do banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) e os números de acesso.

Classificação				Número de Acesso			
Família	**Subfamília**	**Tribo**	**Espécie**	***COI* – Parte 1**	***COI* – Parte II**	**16S**	**18S**
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	*Anisoscelis foliacea*	JQ037895	JQ218470	KC537009	KC537034
			Leptoglossus gonagra	JQ037902	JQ218477	KC537016	KC537041
			Leptoglossus zonatus	JQ037903	JQ218478	KC537017	KC537042
		Acanthocerini	*Athaumastus haematicus*	JQ037896	JQ218471	KC537010	KC537035
		Chariesterini	*Chariesterus armatus*	JQ037898	JQ218473	KC537012	KC537037
		Coreini	*Anasa bellator*	JQ031214	JQ218469	KC537008	KC537033
			Catorhintha guttula	JQ037897	JQ218472	KC537011	KC537036
			Hypselonotus fulvus	JQ037901	JQ218476	KC537015	KC537040
			Sphictyrtus fasciatus	JQ037904	JQ218479	KC537018	KC537043
			Zicca annulata	JQ037905	JQ218480	KC537019	KC537044
		Leptoscelini	*Dallacoris obscura*	JQ037899	JQ218474	KC537013	KC537038
			Dallacoris pictus	JQ037900	JQ218475	KC537014	KC537039
Pentatomidae	Pentatominae	Carpocorini	*Dichelops melacanthus*	JQ218458	JQ218483	KC537022	KC537047
			Mormidea v-luteum	JQ218462	JQ218487	KC537026	KC537051
			Oebalus poecilus	JQ218464	JQ218489	KC537027	KC537052
		Piezodorini	*Piezodorus guildinii*	JQ218465	JQ218490	KC537029	KC537054

Tabela 3. Classificação das espécies, pigmentação da bainha peritoneal, número de lobos testiculares, cariótipo das famílias Coreidae utilizadas para as análises.

Família	Subfamília	Tribo	Espécie	Pigmentação da Bainha Peritoneal	N. Lobos Testiculares	Cariótipo (2n)	Referência
Coreidae	Coreinae	Anisoscelidini	*Anisoscelis foliacea*	Alaranjada	7	24A+2m+X0	Unpublish
			Leptoglossus gonagra	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
			Leptoglossus zonatus	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
		Acanthocerini	*Athaumastus haematicus*	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
		Chariesterini	*Chariesterus armatus*	Translúcida	4	22A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
		Coreini	*Anasa bellator*	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
			Catorhintha guttula	Alaranjada	7	22A+2m+X0	Souza et al., (2009)
			Hypselonotus fulvus	Alaranjada	7	16A+2m+X0	Souza et al., (2009)
			Sphictyrtus fasciatus	Avermelhada	7	16A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
			Zicca annulata	Amarelada	4	20A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
		Leptoscelini	*Dallacoris obscura*	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)
			Dallacoris pictus	Avermelhada	7	18A+2m+X0	Souza et al., (2007a)

Tabela 2. Estatística descritiva das sequências dos genes ribossomais mitocondriais *COI* (região 1 e 2) e 16S e nuclear 18S para a família Coreidae. Si/Sv = número de transições pelo número de transversões.

	***COI* + 16S + 18S**
Composição Nucleotídica	**Coreidae**
Comprimento	2273
N. sítios conservados	1642
N. sítios variáveis	629
N. sítios únicos	181
%A	31,94%
%T	30,79%
%C	19,52%
%G	17,75%
%AT	62,73%
%CG	37,27%
Si/Sv	1,00
Divergências	
Distância p	
Média	0,115
Min-Max	0,003-0,137
Kimura 2-Parâmetros	
Média	0,126
Min-Max	0,003-0152

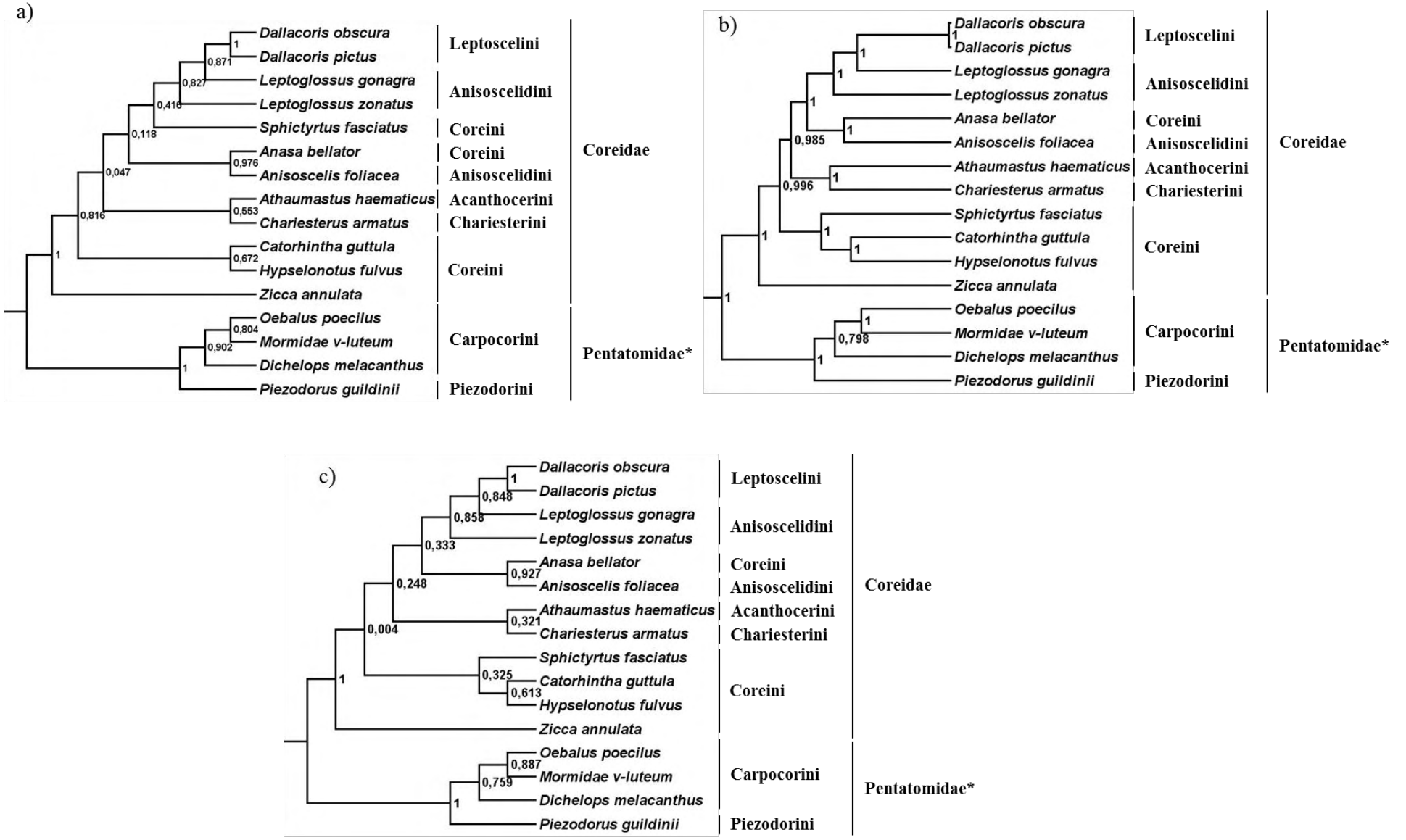

Figura 1. Cenários evolutivos inferidos a partir das análises moleculares dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S das espécies da família Coreidae gerados através dos métodos dos métodos de a) neighbor-joining; b) inferência bayesiana e; c) máxima verossimilhança. *Grupo externo.

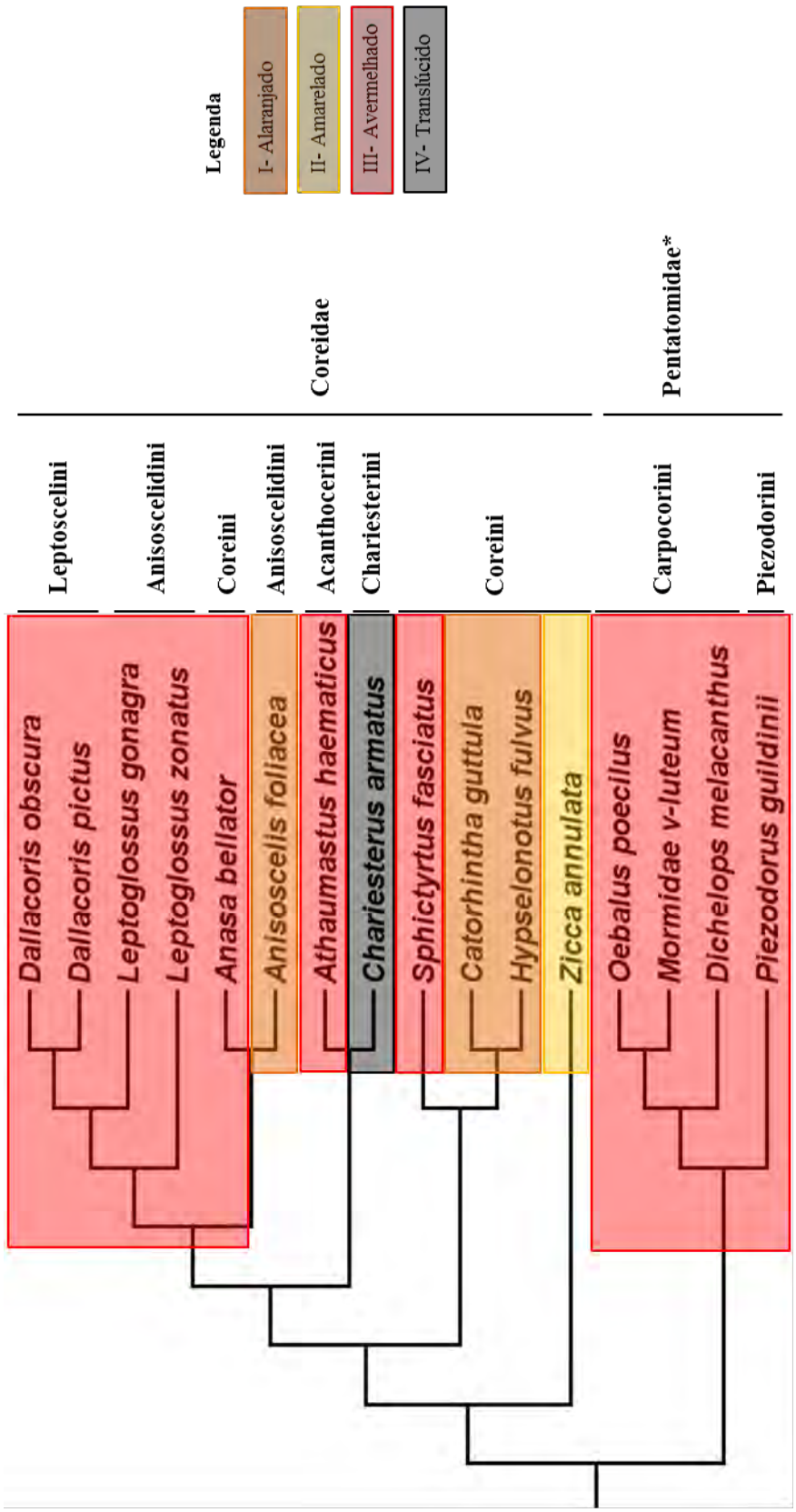

Figura 2. Distribuição do caráter pigmentação da bainha peritoneal das espécies da família Coreidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

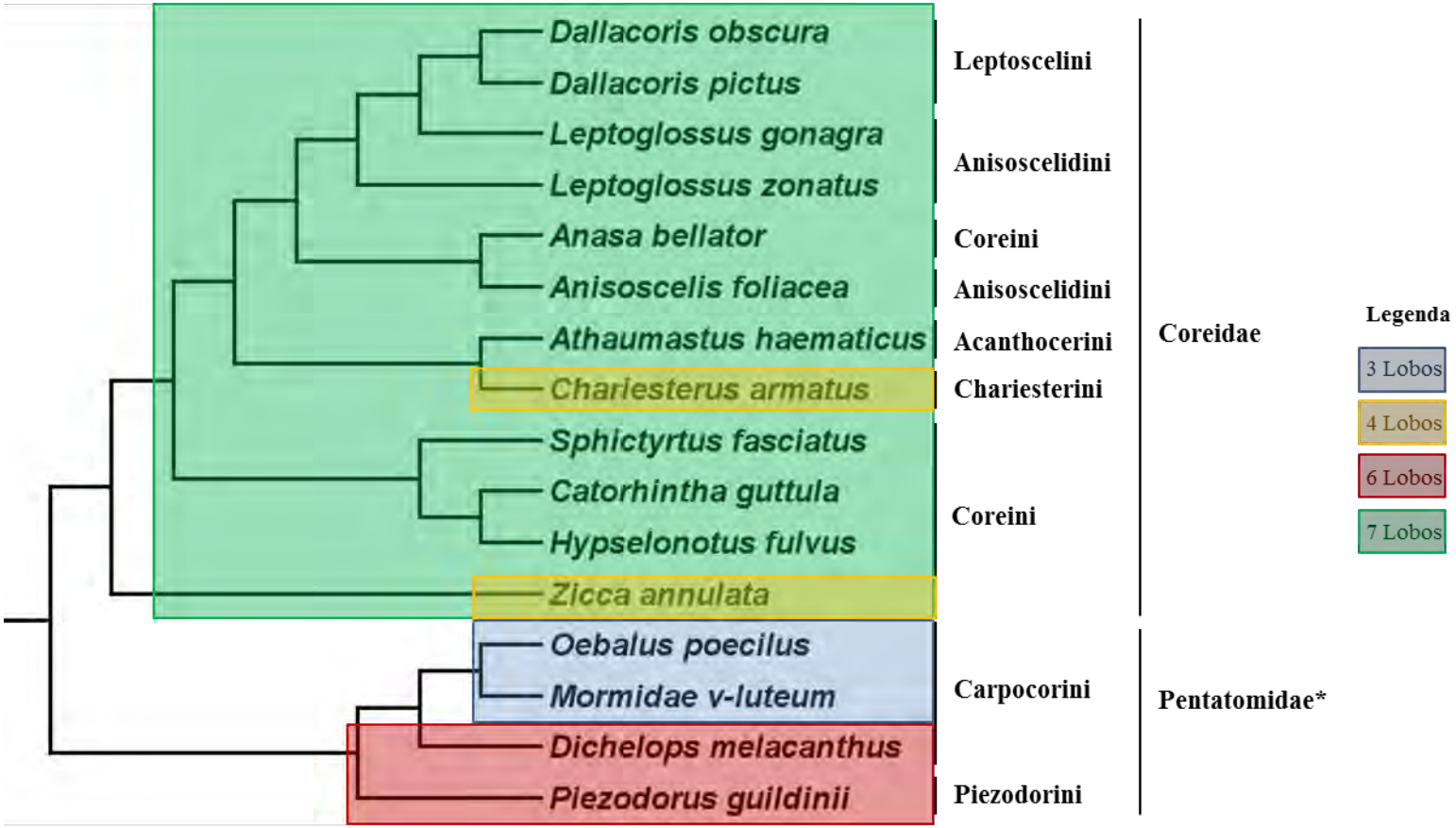

Figura 3. Distribuição do caráter quantidade de lobos testiculares das espécies da família Pentatomidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

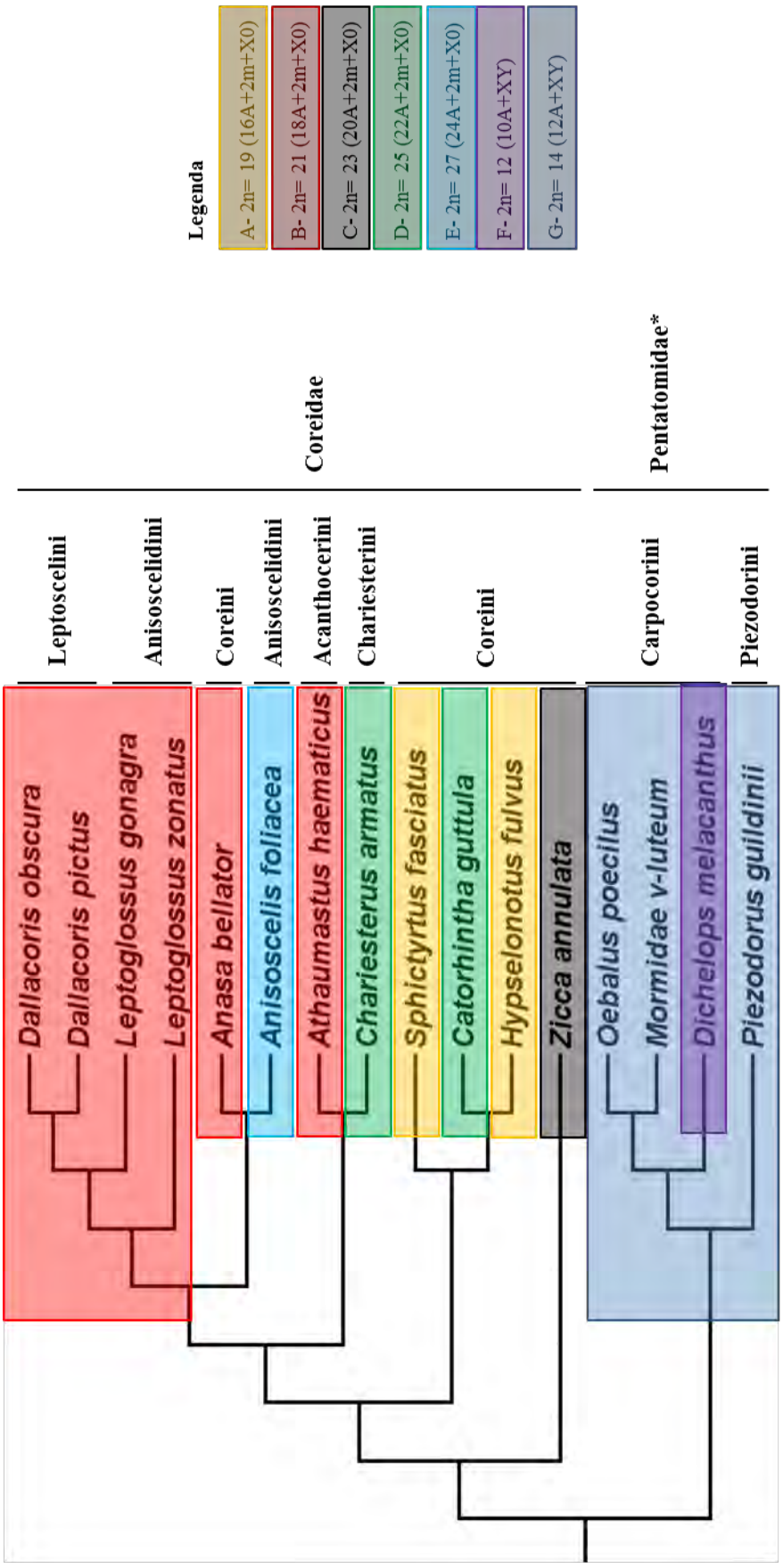

Figura 4. Distribuição do caráter complementos cromossômicos das espécies da família Coreidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

VI. CAPÍTULO 4

Análise evolutiva dos lobos testiculares e aspectos citogenéticos baseada nos genes *COI*, 16S e 18S da família Pentatomidae (Heteroptera)

Hederson Vinicius de SOUZA[1], Cecília Ártico BANHO[1]; Sandra Regina de Carvalho MARCHESIN[2], Mary Massumi ITOYAMA[1†].

[1]UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]UNIP - Universidade Paulista, Campus Juscelino Kubitschek, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
[†]mary@ibilce.unesp.br

Palavras-chave: Cariótipo, Lobo testicular, *Harlequin*, Poliploidia, Pentatomidae.

Resumo

Além da diversidade de insetos descritos, os Heteroptera apresentam certas particularidades entre as espécies, como números variáveis de lobos testiculares e colorações diferentes da bainha peritoneal. Além destas características, algumas espécies da família Pentatomidae possuem um dos lobos testiculares com características morfológicas e celulares diferentes dos demais, levando à formação de espermatozoides com funções diversificadas. Somado a essas características, os Heteroptera possuem cromossomos holocinéticos, que podem levar à diversidade cariotípica. Embora apresente inúmeras características peculiares, como as tratadas anteriormente, o estudo evolutivo destes caracteres precisa de análises mais aprofundadas. O presente trabalho propôs analisar a evolução dos caracteres números de lobos, pigmentação da bainha peritoneal, espermatozoides não fertilizantes e cariótipo, baseando-se no cenário evolutivo obtido através das análises moleculares dos genes *COI*, 16S e 18S, dos quais foi feito o sequenciamento de algumas regiões desses genes em 13 espécies da família Pentatomidae. Os resultados mostraram que a pigmentação da bainha peritoneal não distribuída foi homogeneamente entre as espécies da mesma tribo. O número de lobos

ancestral foi sete, sendo que esse número foi reduzido para três lobos testiculares nas espécies derivadas. Neste contexto evolutivo, notou-se que a evolução de espermatozoides não fertilizantes foi heterogênea entre as tribos. A presença do lobo *harlequin* e células polimégalas, nas espécies basais, corrobora a hipótese sobre a existência de pré-adaptação para a formação de espermatozoides não fertilizantes neste lobo. As fusões e fissões cromossômicas ocorreram de modo disperso no cenário evolutivo, contudo mais espécies devem ser analisadas. Desse modo, este trabalho evidencia a complexidade das distribuições das características testiculares e citogenéticas relatadas através da filogenia molecular.

Introdução

Heteroptera é o maior e mais diversificado grupo de insetos com metamorfose incompleta. Ele é tratado como uma subordem dos Hemiptera. Compreende cerca de 75 famílias, a maioria das quais podem ser encontradas em quase todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas. A sua longa história evolutiva e aparente adaptabilidade resultaram em uma espantosa diversidade biológica e estrutural (SCHUH; SLATER, 1995).

Os Heteroptera possuem testículos formados por compartimentos denominados lobos testiculares, apresentando números variados e coloração da pigmentação diversificada na bainha peritoneal que reveste estes lobos, como ocorrem nas espécies da família Pentatomidae, que podem apresentar até sete lobos testiculares envolvidos por uma bainha peritoneal. Foram encontradas também, espécies que exibem membranas com pigmentações avermelhadas ou amareladas (SOUZA; ITOYAMA, 2010). Em especial, algumas espécies da família Pentatomidae podem apresentar um dos lobos testiculares do tipo *harlequin*, o qual difere dos demais por apresentar células espermatogoniais com pareamento meiótico irregular, associação não específica dos autossomos bivalentes, arranjos anômalos dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica anômala e fusões celulares, resultando na produção de espermatozoides com números cromossômicos altamente variados. Há relatos deste tipo de lobo em 15 gêneros de três subfamílias de Pentatomidae (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) (REBAGLIATI et al., 2005). Outra característica observada em Heteroptera da família Pentatomidae é a polimegalia que resulta não somente em

espermatozoides de diferentes tamanhos, mas também de ploidias diferentes (BOWEN, 1922; SCHRADER, 1960a,b).

Os resultados dos estudos citogenéticos até agora relatados na literatura mostram que os Heteroptera são caracterizados por possuírem cromossomos holocêntricos, não apresentarem estrutura cinetocórica nas células meióticas (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO, RUTHMANN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996) e a atividade cinética ser restrita às extremidades dos cromossomos (MOTZKO; RUTHMANN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996).

De acordo com Jacobs (2004), como todos os Heteroptera apresentam cromossomos holocêntricos, fragmentos que se originam devido a quebras cromossômicas, geralmente movem-se regularmente para os polos durante a anáfase e sobrevivem por muitas gerações celulares. Fragmentação pode, portanto, levar facilmente ao aumento do número cromossômico. Da mesma maneira, fusão cromossômica é, também, teoricamente mais fácil em organismos com cromossomos holocêntricos, pois não ocorrem problemas associados com a formação de cromossomos dicêntricos.

Na família Pentatomidae o número cromossômico é mais conservado, mas há relatos de que o número 2n, em machos, varia de seis a 27, sendo mais frequente 2n= 14 cromossomos (85%) (REBAGLIATI et al., 2005). Esta condição cromossômica pode ser considerada a mais ancestral da ordem, pois, a maior parte das famílias de Heteroptera possui um número de cromossomos comparativamente mais alto do que os Pentatomidae e, portanto, devem ser considerados mais recentes na evolução deste grupo (BANERJEE, 1959).

Embora apresente inúmeras características peculiares, como as tratadas anteriormente, a evolução da família Pentatomidae é pouco explorada. Assim, o presente trabalho propôs-se a investigar o cenário evolutivo de 13 espécies dessa família procurando inferir aspectos da evolução do número de lobos, da pigmentação da bainha peritoneal, dos espermatozoides não fertilizantes e do cariótipo, com base na análise evolutiva dos marcadores moleculares *COI*, 16S e 18S.

Material e Métodos

Foram analisadas as espécies: *Antiteuchus tripterus*, *Chlorocoris complanatus*, *Dichelops melacanthus*, *Edessa meditabunda*, *Euschistus heros*, *Loxa deducta*, *Mormidea v-luteum*, *Oebalus poecilus*, *Oebalus ypsilongriseus*, *Piezodorus guildinii*, *Platycarenus umbraculatus*, *Proxys albopunctulatus* e *Thyanta perditor* (Pentatomidae) (Tabela 1), coletadas, na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil (20º 47' 13" S, 49° 21' 38" W) e fixadas em etanol absoluto. Para obtenção do DNA foram utilizados fragmentos da musculatura torácica dos espécimes coletados utilizando o kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

Os oligonucleotídeos inicializadores utilizados para as reações de amplificação foram os 5′-CCGGTTTGAACTCAGATCATGT-3′ com 5′-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3′ para o gene 16S (SIMON et al., 1994) e 5′-AACCTGGTTGATCCTGCCA-3′ com 5′-CTGAGATCCAACTACGAGCTT-3′ para o gene 18S (BARGUES, MAS-COMA, 1997), 5'-TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' com 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3 para região inicial do *COI* (FOLMER et al., 1994) e 5'-AGCAGGAATTTCATCAATTTT-3' com 5'-CTGTAAATATGTGATGTGCTC-3' para região mediana do *COI* (MURAJI, et al., 2000). Tais amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler em um volume total de reação de 10 μL, utilizando 100 ng de DNA; 0,2 mM de cada par de oligonucleotídeo; 100 mM de dNTP; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 a 3 mM de $MgCl_2$ e 0,5 unidades da DNA polimerase Platinum® (Invitrogen).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

As regiões gênicas amplificadas foram alinhadas com o programa ClustralW (THOMPSON et al., 1997). As análises de Composição Nucleotídicas e das distâncias foram feitas com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Foram utilizadas as distâncias p, assumindo o número de diferenças entre os sítios, pelo total de sítios da sequência e a distância baseada em Kimura 2-parâmetros por assumir as diferentes taxas entre transições e transversões (KIMURA, 1980).

Para determinar se existe incongruência significativa entre as sequências dos fragmentos dos genes analisados no presente trabalho, foi feito o teste de diferença de incongruência pelo tamanho (ILD) pelo programa PAUP*4.0b10 com 100 interações.

Foram utilizadas as espécies *Thaumastella namaquensis* (Thaumastellidae) e *Cydninae* sp. (Cydnidae) para representar o grupo externo. Essa escolha foi feita a partir da análise evolutiva da ordem Pentatomomorpha obtida por Li et al. (2005) e por essas espécies já possuírem as amplificações obtidas pelos marcadores moleculares estudados, disponíveis na literatura.

Para a formação do cenário evolutivo, foi utilizado o método de neighbor-joining através do modelo de Kimura 2-Parâmetros (K2P) e máxima verossimilhança com o modelo General Time Reversible (GTR) através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). O cenário evolutivo feito pelo método de inferência Bayesiana foi obtido através do programa MrBayes v3.2 (RONQUIST et al. 2012).

Resultados

Foram obtidas 13 sequências (uma de cada espécie) dos genes *COI* - regiões 1 e 2, 16S e 18S da família Pentatomidae. As espécies amostradas estão descritas na Tabela 1. O teste de homogeneidade da partição (ILD) nas partições formadas pelos fragmentos dos genes *COI*, 16S e 18S teve como resultado p= 1.00, o qual indica que as evidências são insuficientes para rejeitar a hipótese de incongruência. Por isso, tais fragmentos puderam ser combinados e, assim, formaram 2252 sítios (3 genes) dos quais, 1572 eram sítios conservados e 677 sítios variáveis e 212 sítios únicos (Tabela 2). Essa sequência concatenada apresentou 63,13% de conteúdo A e T, sendo constatada uma taxa de transição/transversão (Si/Sv) de 0,92 (Tabela 2). Na análise de distância foi verificado uma média de 0,117, variando de 0,073 a 0,149 para a distância p e 0,128, variando de 0,077 a 0,169 para a distância Kimura 2-parâmetros (Tabela 2).

Nas análises filogenéticas obtidas pelos métodos de neighbor-joining (Figura 1a), análise Bayesiana (Figura 1b) e máxima verossimilhança (Figura 1c) foi verificado que o agrupamento pertencente à tribo Carpocorini é monofilético, sendo esta a tribo mais derivada. Já o agrupamento formado pelas espécies *T. perditor*, *P. albopunctulatus* e *P. guildinii* comportou-se de modo diferente nas análises. Pelos

métodos de neighbor-joining (Figura 1a) e inferência Bayesiana (Figura 1b), a espécie *T. perditor* divergiu anteriormente às espécies *P. albopunctulatus* e *P. guildinii*, enquanto que pelo método de máxima verossimilhança (Figura 1c) a espécie que divergiu anteriormente foi *P. guildinii*. Outra diferença notada foi com relação às espécies *A. tripterus*, *E. meditabunda* e *P. umbraculatus* que, pelo método de neighbor-joining (Figura 1a) e máxima verossimilhança (Figura 1c) formam um agrupamento, cuja espécie *A. tripterus* divergiu anteriormente. Já na inferência Bayesiana a espécie que primeiro divergiu foi *P. umbraculatus* (Figura 1b).

Para as investigações da evolução dos caracteres pigmentação da bainha peritoneal, números de lobos, cariótipos e espermatozoides não fertilizantes, descritos na Tabela 3, foi utilizado o cenário evolutivo obtido pelo método de inferência Bayesiana devido aos suportes dos ramos, dados pela distribuição a *posteriori*, serem mais robustos.

No estudo evolutivo do caráter pigmentação da bainha peritoneal (Figura 2), pode-se observar que as espécies possuidoras dos pigmentos que conferem a coloração avermelhada à bainha peritoneal, são representadas pelas espécies da tribo Carpocorini, portanto derivadas, e também nas espécies *A. tripterus* e *P. umbraculatus* consideradas basais. *P. albopunctulatus*, também com esses pigmentos presentes em sua bainha peritoneal, encontrou-se fora de ambos os grupos. As espécies possuidoras dos pigmentos amarelos e vermelhos (*P. guildinii*, *C. complanatus* e *E. meditabunda*) não possuíram um ancestral comum direto. E as espécies *T. perditor* (pigmentação amarelada na membrana interna e vermelha na membrana externa) e *L. deducta* (pigmentação amarela e amarela em ambas as membranas) apresentaram característica não compartilhada com as demais espécies. Para as espécies pertencentes ao grupo externo, não foi encontrado registro, desses caracteres, na literatura.

Com relação à quantidade de lobos testiculares (Figura 3), foi possível notar que as espécies possuidoras de sete lobos são as basais, exceto por *A. tripterus* e *E. meditabunda* que possuíram seis e quatro lobos respectivamente. As espécies mais derivadas apresentaram três lobos testiculares. As espécies possuidoras de seis lobos testiculares formaram um agrupamento parafilético que se encontrou entre os agrupamentos das espécies com sete e três lobos testiculares, exceto pela espécie *T. perditor*, que embora, nesse cenário evolutivo, agrupou-se com as espécies com seis

lobos, sendo que essa espécie possuiu apenas três. Não há registros, na literatura, de informações referentes dos lobos testiculares das espécies do grupo externo.

Já na análise envolvendo o caráter cariótipo (Figura 4), foi verificado que apenas a espécie *D. melacanthus* apresentou 2n=12 (10A+XY). As demais apresentaram 2n=14 (12A+XY). Para a espécie *Cydnidae* sp. foi igual a 2n=14 (12A+XY) e para a espécie *T. namaquensis* foi igual a 2n= 20 (16A+2m+XY)

Os lobos testiculares que apresentam células *harlequin* e poliploides (Figura 5) estão presentes nas espécies *A. tripterus* e *C. complanatus*, contudo, estas espécies não se agruparam. Da mesma forma, as espécies possuidoras apenas de células testiculares com poliploides, *E. hero*s e *L. deducta*, também não apresentaram um ancestral comum direto. Contudo, foi possível verificar que as espécies possuidoras do lobo *harlequin* e com células poliploides divergiram primeiro que as espécies possuidoras apenas de células com poliploidias. Essas informações a respeito do grupo externo não estão disponíveis na literatura.

Discussão

A evolução das espécies de Heteroptera da família Pentatomidae analisada através de dados moleculares, ainda é pouco explorada na literatura, sendo predominantemente na subordem Pentatomomorpha, (Li et al., 2005). Neste estudo, cenários evolutivos, apenas das espécies da família Pentatomidae foram analisados através de dados moleculares dos genes *COI*, 16S e 18S. Essas análises mostraram-se concordantes na maioria dos ramos e, por isso, a inferência evolutiva de caracteres, através dessas topologias geradas, é facilitada.

Uma dessas características, ainda pouco explorada em Heteroptera é a investigação da pigmentação da bainha peritoneal que envolve os lobos testiculares. Souza et al. (unpublished) observaram variedades de colorações dessa bainha nas famílias Pentatomidae, sendo encontrados pigmentos que conferem as colorações avermelhada, amarelada ou ainda sem pigmentação aparente. Neste trabalho, foi verificado que na família Pentatomidae, a bainha peritoneal com pigmentação avermelhada está distribuída de maneira heterogênea pela filogenia, sendo representada tanto nas espécies basais, (*P. umbraculatus*), como nas derivadas como na tribo

Carpocorini. As espécies da família Pentatomidae, ainda podem apresentar duas membranas pigmentadas, que podem ser de mesma cor (amarelada), ou de cores diferentes (externa amarelada e interna avermelhada) ou ambas de mesma cor (amarelada ou avermelhada) (SOUZA et al., 2011). As espécies formadas por duas membranas amareladas, não se agruparam. Devido ao cenário evolutivo mostrar uma distribuição heterogênea desse caráter, é possível inferir que as pigmentações podem ser perdidas de modo independente entre as espécies.

Ainda, os testículos de Heteroptera são divididos por um tecido conectivo em subunidades denominadas lobos. O número mais comum é sete, embora haja variações entre tribos e espécies (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005). No cenário evolutivo analisado, neste trabalho, para esta característica, em Pentatomidae, nota-se a formação de três agrupamentos distintos, sendo que o agrupamento formado pelas espécies com sete lobos testiculares divergiu primeiro, seguido pelo agrupamento formado pelas espécies com seis lobos e agrupamento que contém as espécies mais derivadas, com três lobos. Assim, é possível propor que houve perda de lobos testiculares na evolução destas espécies. Neste cenário há algumas exceções como *A. tripterus* que possui seis lobos testiculares e está inserida no agrupamento das espécies com sete lobos testiculares. Contudo, Souza et al. (2007) encontraram um lobo internalizado em outro lobo testicular, o que pode sugerir outro modo evolutivo para diminuição do número dos lobos testiculares.

As espécies da família Pentatomidae além de apresentar variações nos números dos lobos testiculares, podem ou não apresentar um lobo distinto denominado de *harlequin*. Entre os 15 gêneros estudados com relação à presença deste lobo, 11 pertencem à subfamília Discocephalinae, três à Pentatominae e um à Edessinae (REBAGLIATI et al., 2005). Além disso, entre as oito subfamilias estudadas, somente três (Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae) possuíam este lobo. Na subfamília Discocephalinae, somente as espécies *Platycarenus notulatus* e *P. umbraculatus* (Pentatomidae, Discocephalinae, Discocephalini) não o possuem. Contudo, em uma investigação mais aprofundada, Souza e Itoyama (2011) constataram diferenças fisiológicas envolvendo os espermatozoides dos lobos 4 a 6, sendo mais pronunciadas no 5 na espécie *P. umbraculatus*. Esta espécie foi considerada basal no cenário evolutivo do presente trabalho. Neste contexto, nota-se que a evolução de

espermatozoides não fertilizantes não é homogênea. A presença das espécies possuidoras do lobo *harlequin* e com células polimégalas entre as espécies basais corrobora a hipótese de Souza e Itoyama (2010) sobre a existência de pré-adaptação para a formação de espermatozoides não fertilizantes neste lobo, algumas espécies, por exemplo, embora tivessem pré-adaptação para formação de espermatozoides não fertilizantes, provavelmente tenha sido mais vantajosa a redução do número de lobos, como ocorreu com as espécies do gênero *Oebalus*. Em contrapartida, nas espécies *A. tripterus* e *C. complanatus*, houve formação de espermatozoides não fertilizantes.

Schrader (1945, 1960a,b) verificou que as forças da evolução persistiram com os lobos *harlequins*, uma estrutura que produz espermatozoides heteropoliploides não usados na fertilização. Ele sugeriu que esses espermatozoides devam fornecer nutrientes adicionais, especialmente nucleoproteínas para o desenvolvimento dos ovos. Como os espermatozoides *harlequins* são provavelmente não férteis, o argumento de ocorrência de poliespermia é duvidoso. Nem a ocorrência regular de poliespermia, em geral, nem entrada de espermatozoides *harlequin* nos ovos, em particular, foram investigados em Pentatominae (SWALLOW; WILKINSON, 2002). Embora não observados por Schrader (1945, 1960a,b), espermatozoides heteropoliploides poderiam também ter outros papéis como na nutrição (isto é, para as fêmeas ou para os espermatozoides fertilizantes, SWALLOW; WILKINSON, 2002).

A capacidade de fertilização dos espermatozoides de diferentes morfologias ainda não foi demonstrada. Pelo menos para os espermatozoides maiores, um papel nutricional, similar aos que foram propostos para os espermatozoides *harlequin* (SCHRADER, 1960b), poderia ser vantajoso como uma possível superioridade para espermatozoides de múltiplas morfologias.

McLain (1998) observou que os machos da espécie *Nezara viridula* (Pentatomidae) que não copulavam tinham os lobos *harlequin* menores do que os que copulavam. MacLain (1998) inferiu que fêmeas receberam benefícios não-genéticos dos machos. A preferência sexual para alguns grupos pode explicar a força evolutiva para a manutenção desses lobos, bem como sua distribuição não homogênea entre os agrupamentos formados nesse trabalho.

Com relação à análise cariotípica nas espécies de Pentatomidae os complementos cromossômicos são mais conservados do que nas outras famílias de

Heteroptera, sendo o mais frequente de 2n= 14 (85%) (REBAGLIATI et al., 2005). A exceção destas espécies é *D. melacanthus* que apresentou 10A+XY. Souza et al. (2011) estudaram o complemento cromossômico dessa espécie e sugeriram que houve uma fusão recente de dois autossomos, formando um cromossomo maior. Tal hipótese é corroborada neste trabalho, uma vez que *D. melacanthus* apresentou essa característica como autapomorfia.

Com relação às famílias presentes no grupo externo, Ueshima (1979) descreve Cydninae (Cydnidae) como apresentando complemento cromossômico de 12A+XY. Jacobs (1989) encontrou um número cromossômico de 20=16A+2m+XY, mas também foram encontrados 17 e 18 cromossomos em populações de *Thaumastella namaquensis* (Thaumastellidae). Henry (1997) sugeriu que os m-cromossomos é uma sinapomorfia que define um amplo grupo dentro de Pentatomomorpha, ainda que perdido em poucos táxons (Berytidae, Lygaeinae, e Piesmatidae), e que, devido à presença de m-cromossomos em Thaumastellidae, pode não pertencer a Pentatomoidae. A presença de m-cromossomos pode relacionar Thaumastellidae a Coreidae, contudo a presença do cromossomo Y o relacionaria à família Pentatomidae.

Desse modo, verifica-se a complexidade das relações evolutivas das características testiculares e citogenéticas mostradas nesse trabalho, verificada com base na filogenia molecular.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Jocélia Grazia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Profa. Dra. Aline Barcellos do Museu de Ciências Naturais de Porto Alegre, Brasil, que nos auxiliou na identificação das espécies. À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros.

Referências Bibliográficas

BANERJEE, M. R. A study of chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). **Proceedings of the Zoological Society**, v. 11, n. 1, 1959.

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on

18S rDNA Sequences**. Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 569–577, 1997.

BOWEN, R. H. Notes on the occurrence of abnormal mitosis in spermatogenesis. **Biological Bulletin**, n. 43, p. 184-203, 1922.

BUCK, R. C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus:* the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

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.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol**. v. 3, p. 294-297, 1994.

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.

HENRY, T. J. Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. **Ann. Entomol. Soc. Am**., v. 90, p. 275–301, 1997.

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

JACOBS, D. H. A new species of Thaumastella with notes on the morphology, biology and distribution of the two southern African species (Heteroptera: Thaumastellidae). **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 52, n. 2, p. 301-316, 1989.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LI H. M.; DENG R. Q.; WANG J. W.; CHEN Z. Y.; JIA F. L., WANG X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 2, p. 313-326, 2005.

McLAIN, D. K. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. **Animal Behaviour**, n. 55, p.1191-1201, 1998.

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

MURAJI, M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial *COI* fragment in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, p. 301-307, 2000.

NICKLAS, R. B. The relationship between DNA content and alternative meiotic patterns in certain Discocephalinids (Pentatomidae; Heteroptera). **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 2, p. 486–490, 1961.

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

RONQUIST F.; TESLENKO M.; VAN DER MARK P.; AYRES D.L.; DARLING A.; HÖHNA S.; LARGET B.; LIU L.; SUCHARD M.A.; HUELSENBECK J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.

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

SCHRADER, F. Cytological and evolutionary implications of aberrant chromosome behavior in the *harlequin* lobe of some Pentatomidae (Heteroptera). **Chromosoma**, n. 11, p. 103-128, 1960a.

SCHRADER, F. Evolutionary aspects of aberrant meiosis in some Pentatominae (Heteroptera). **Evolution**, n. 14, p. 498-508, 1960b.

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

SCHRADER, F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). **Biological Bulletin**, n. 88, p. 63-70, 1945.

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

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

SIMON, C.; FRATI F.; BECKENBACH A.; CRESPI B.; LIU H.; FLOOK P.; Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n.6, p. 651-701, 1994.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M.Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of heteropyknotic chromatin and silver-stained material in *Platycarenus umbractulatus* (Pentatomidae: Discocephalinae). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 55, p. 65-72, 2011.

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche: A Journal of Entomology (Psyche)**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

SOUZA, H. V.; MURAKAMI, A. S.; MOURA, J; ALMEIDA, E. C.; MARQUES, I. F. G.; ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, p. 333-345, 2011.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphisms in Insects. **Biol. Rev.**, n. 77, p.153-182, 2002.

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

THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGUNS, D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4881, 1997.

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

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

Tabela 1. Classificação das espécies analisadas obtidas a partir do banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) e os números de acesso.

Classificação				Número de Acesso			
Família	**Subfamília**	**Tribo**	**Espécie**	***COI* – Parte 1**	***COI* – Parte II**	**16S**	**18S**
Pentatomidae	Discocephalinae	Discocephalini	*Antiteuchus tripterus*	JQ218456	JQ218481	KC537020	KC537045
			Platycarenus umbraculatus	JQ218466	JQ218491	KC537030	KC537055
	Edesinae	Edessini	*Edessa meditabunda*	JQ218459	JQ218484	KC537023	KC537048
	Pentatominae	Carpocorini	*Dichelops melacanthus*	JQ218458	JQ218483	KC537022	KC537047
			Euschistus heros	JQ218460	JQ218485	KC537024	KC537049
			Mormidea v-luteum	JQ218462	JQ218487	KC537026	KC537051
			Oebalus ypsilongriseus	JQ218463	JQ218488	KC537028	KC537053
			Oebalus poecilus	JQ218464	JQ218489	KC537027	KC537052
		Chlorocorini	*Chlorocoris complanatus*	JQ218457	JQ218482	KC537021	KC537046
			Loxa deducta	JQ218461	JQ218486	KC537025	KC537050
		Pentatomini	*Proxys albopunctulatus*	JQ218467	JQ218492	KC537031	KC537056
			Thyanta perditor	JQ218468	JQ218493	KC537032	KC537057
		Piezodorini	*Piezodorus guildinii*	JQ218465	JQ218490	KC537029	KC537054
Thaumastellidae			*Thaumastella namaquensis*	EF641176	EF641176	EF641148	EF641222
Cydnidae	Cydninae		*Cydninae* sp.	EF641156	EF641156	EF641129	EF641201

Tabela 2. Estatística descritiva das sequências dos genes ribossomais mitocondriais *COI* (região 1 e 2) e 16S e nuclear 18S para a família Pentatomidae. Si/Sv = número de transições pelo numero de transversões.

	***COI* + 16S + 18S**
Composição Nucleotídica	**Pentatomidae**
Comprimento (sítios)	2252
N. sítios conservados	1572
N. sítios variáveis	677
N. sítios únicos	212
%A	33,29%
%T	29,84%
%C	19,49%
%G	17,38%
%AT	63,13%
%CG	36,87%
Si/Sv	0,92
Divergências	
Distância p	
Média	0,117
Min-Max	0,073-0,149
Kimura 2-Parâmetros	
Média	0,128
Min-Max	0,077-0,169

Tabela 3. Classificação das espécies, pigmentação da bainha peritoneal, número de lobos testiculares, cariótipo, presença ou não de lobo *harlequin* e polimegalia da Pentatomidae utilizadas para as análises. *Presença de um lobo testicular internalizado.

Subfamília	Tribo	Espécie	Pigmentação da Bainha Peritoneal	N. Lobos Testiculares	Lobo *Harlequin*	Polimegalia	Cariótipo (2n)	Referência
Discocephalinae	Discocephalini	*Antiteuchus tripterus*	Avermelhada	6*	5	4 e 6	12A+XY	Souza et al., (2007b)
		Platycarenus umbraculatus	Avermelhada	7	Não	Não	12A+XY	Souza; Itoyama, (2011)
Edesinae	Edessini	*Edessa meditabunda*	Externa amarelada e interna avermelhada	4	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2011)
Pentatominae	Carpocorini	*Dichelops melacanthus*	Avermelhada	6	Não	Não	10A+ XY	Souza et al., (2011)
		Euschistus heros	Avermelhada	6	Não	4 e 6	12A+XY	Souza; Itoyama (2010)
		Mormidea v-luteum	Avermelhada	3	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2008)
		Oebalus ypsilongriseus	Avermelhada	3	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2008)
		Oebalus poecilus	Avermelhada	3	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2008)
	Chlorocorini	*Chlorocoris complanatus*	Interna e externa amarelada	7	5	4 e 6	12A+XY	Souza et al., (2011)
		Loxa deducta	Interna e externa amarelada	7	5	Não	12A+XY	Souza et al., (2011)
	Pentatomini	*Proxys albopunctulatus*	Avermelhada	6	Não	4 e 6	12A+XY	Souza et al., (2011)
		Thyanta perditor	Amarelada	3	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2011)
	Piezodorini	*Piezodorus guildinii*	Externa amarelada e interna avermelhada	6	Não	Não	12A+XY	Souza et al., (2011)

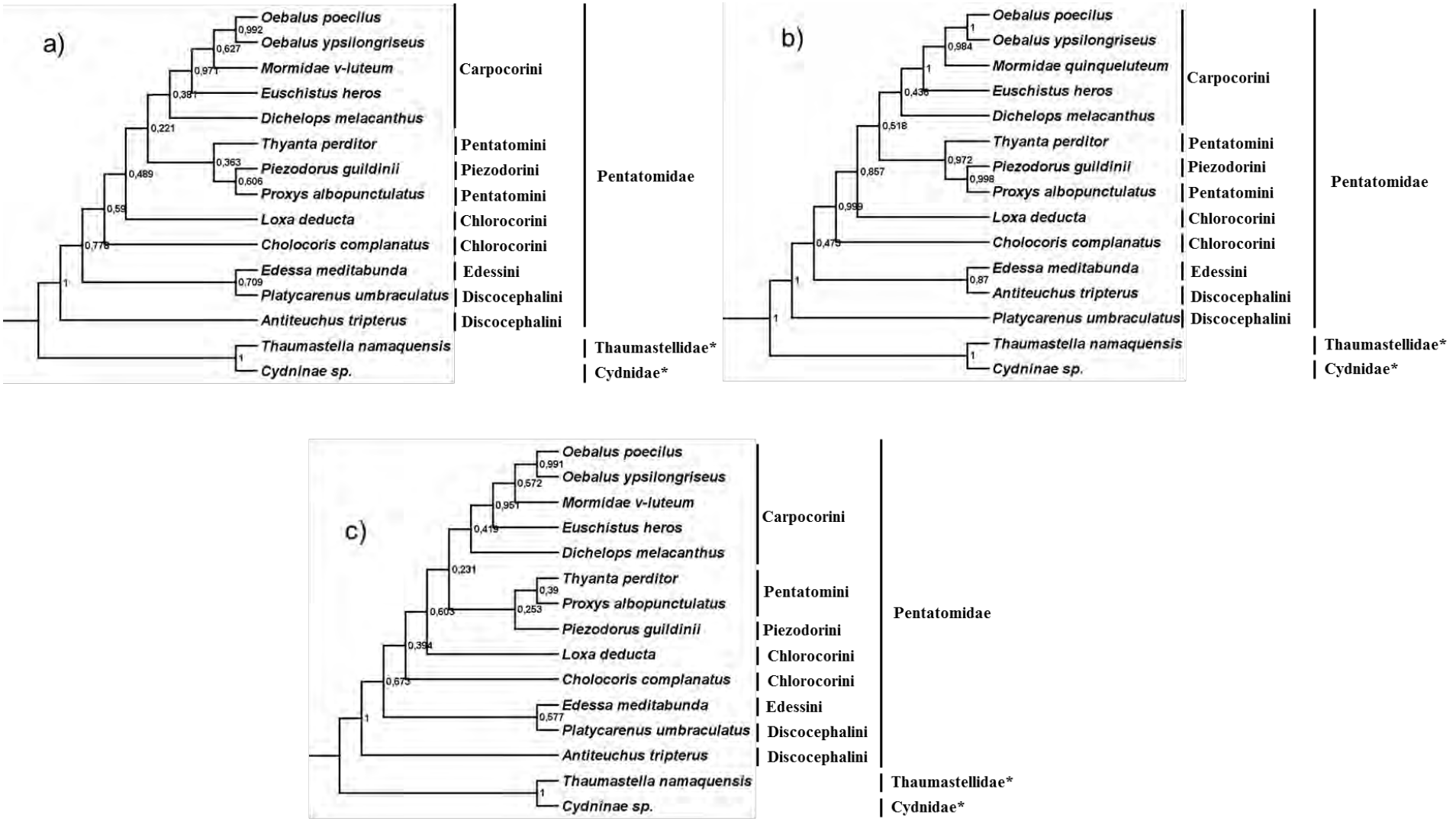

Figura 1. Cenários evolutivos inferidos a partir das análises moleculares dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S das espécies da família Pentatomidae gerados através dos métodos dos métodos de a) neighbor-joining; b) inferência bayesiana e; c) máxima verossimilhança. *Grupo externo.

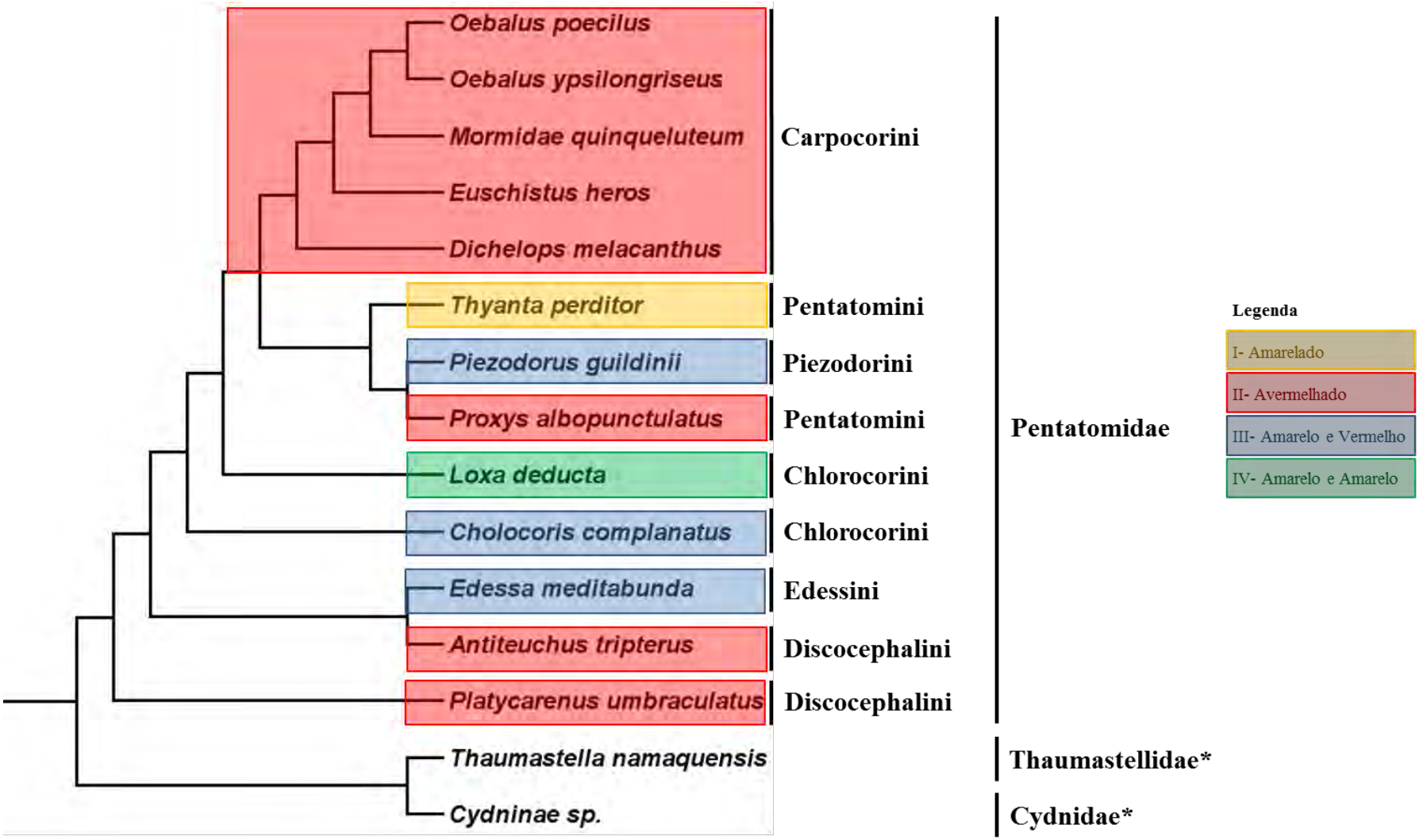

Figura 2. Distribuição do caráter pigmentação da bainha peritoneal das espécies da família Coreidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

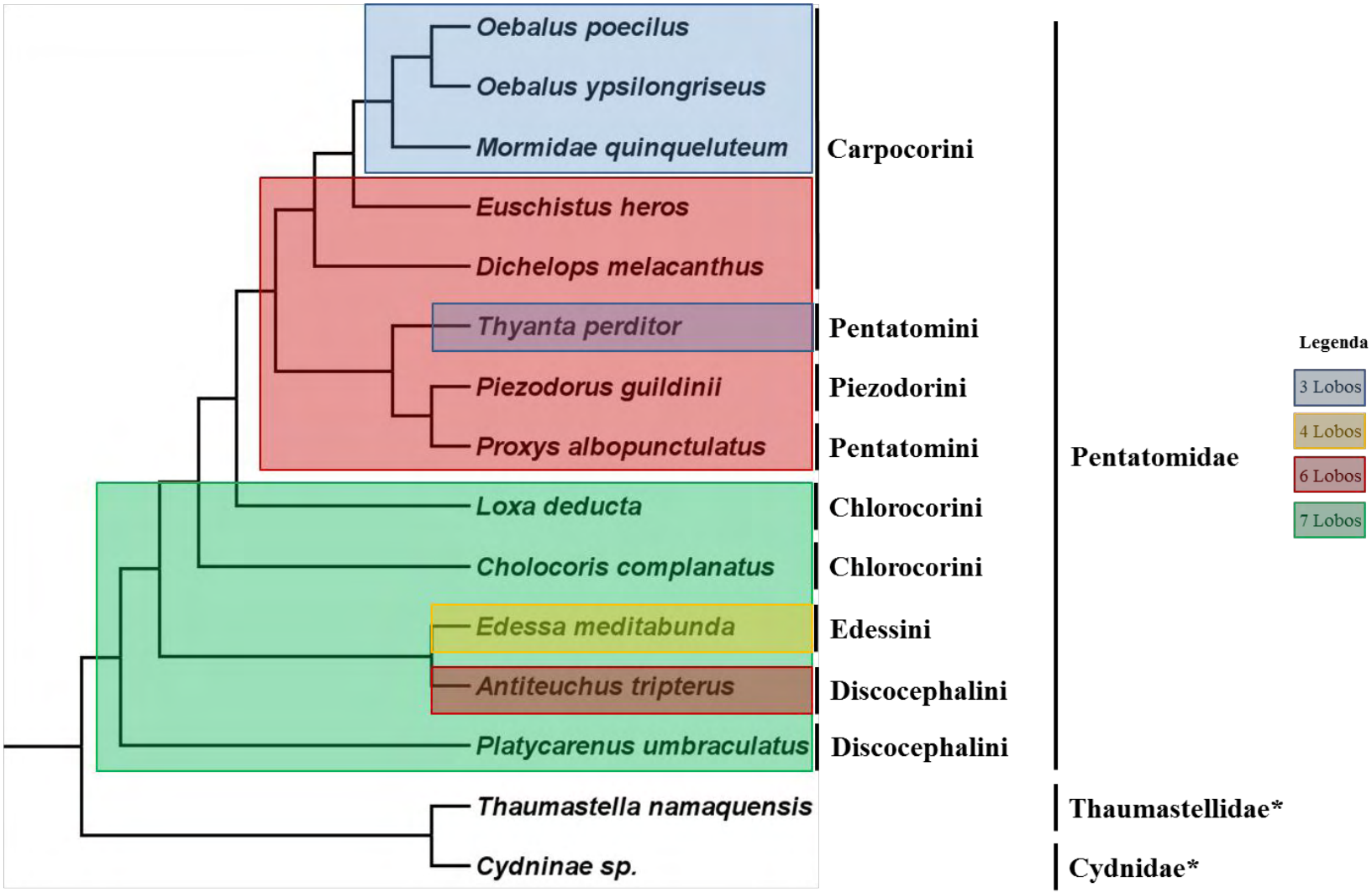

Figura 3. Distribuição do caráter quantidade de lobos testiculares das espécies da família Pentatomidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

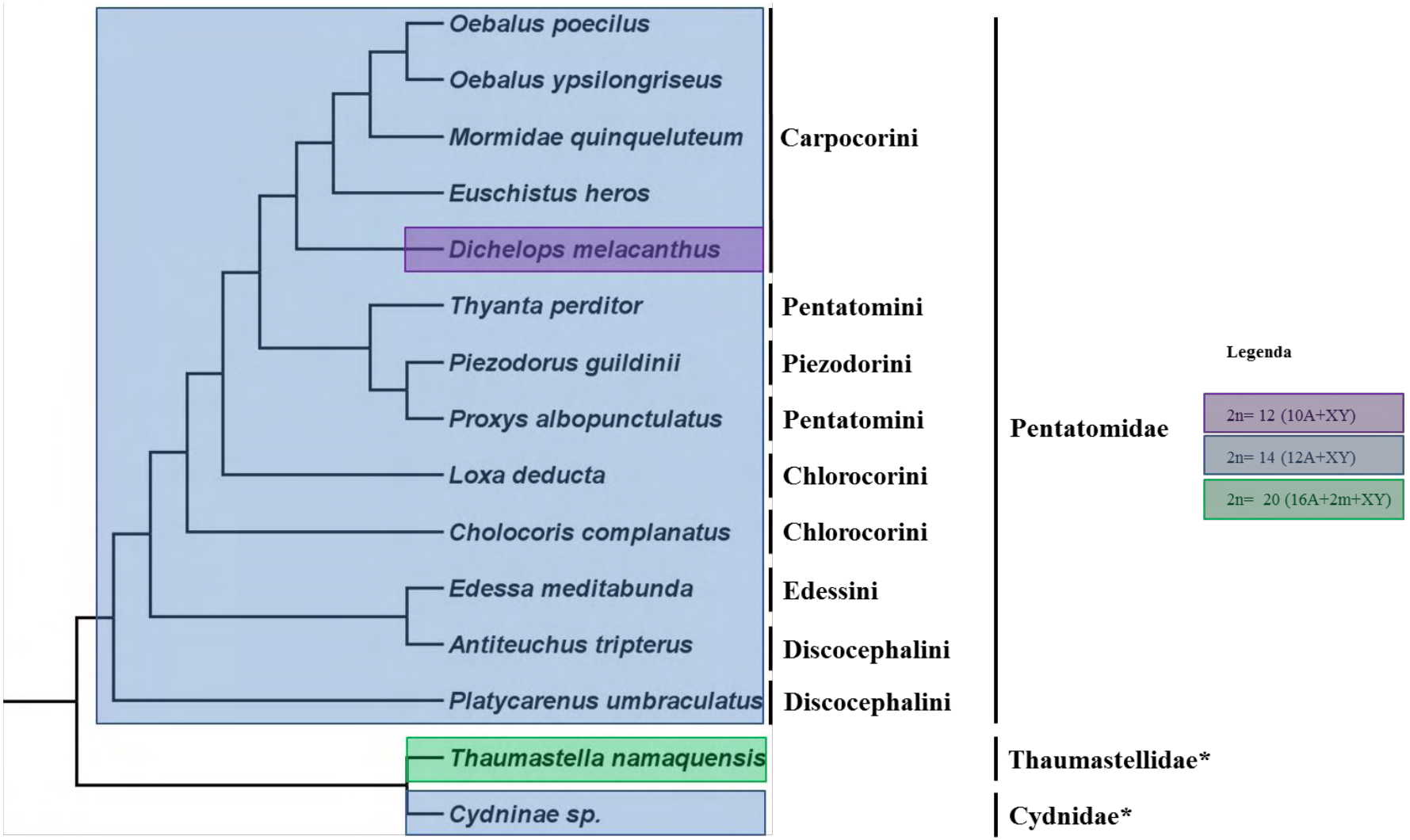

Figura 4. Distribuição do caráter complementos cromossômicos das espécies da família Pentaomidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

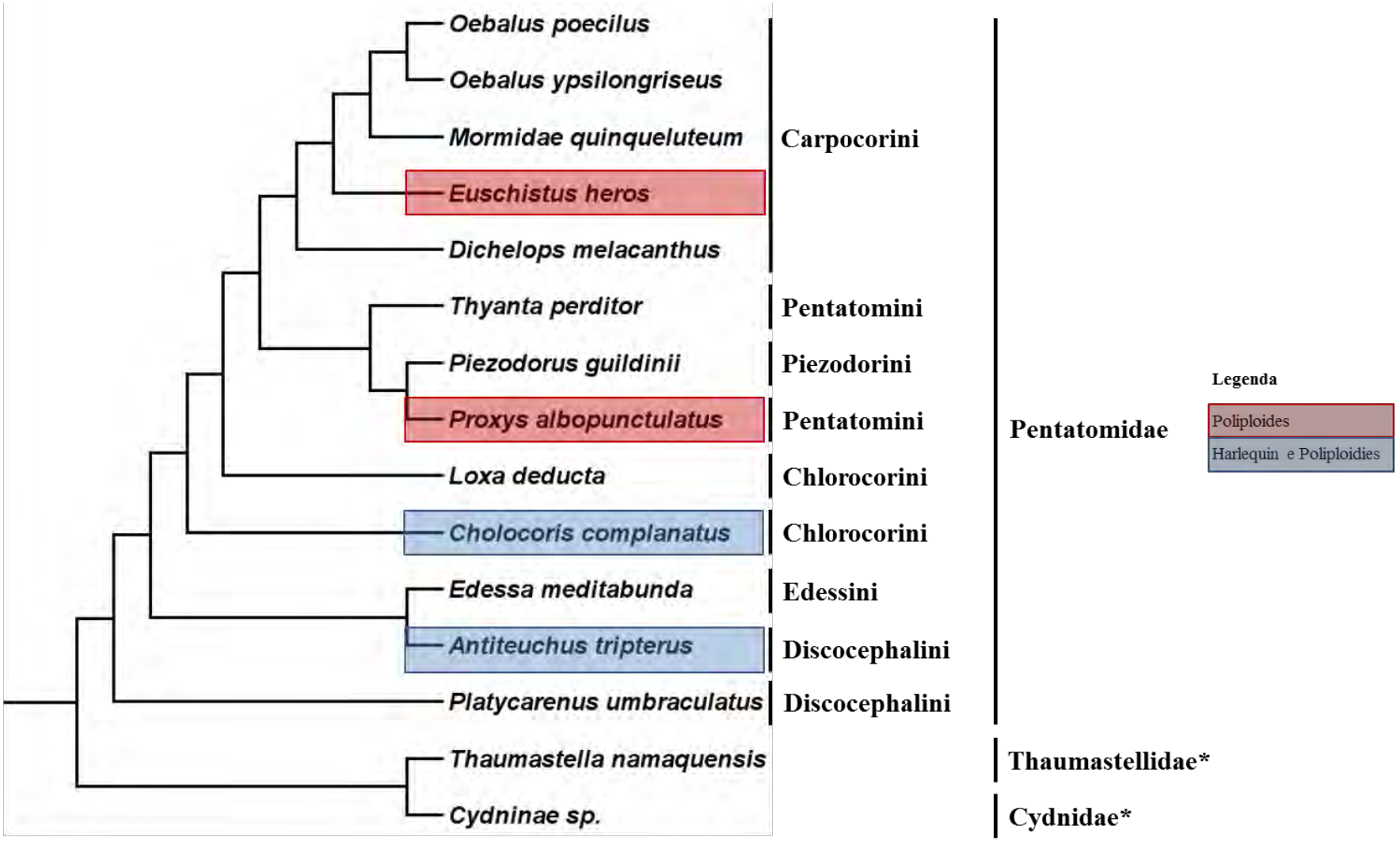

Figura 5. Distribuição do caráter lobo harlequin e células poliploides das espécies da família Pentatomidae inferida pela filogenia gerada através dos genes mitocondriais *COI* (região 1 e 2), 16S e nuclear 18S. *Grupo externo.

VII. CAPÍTULO 5

Análise *in silico* do potencial informativo para inferências evolutivas dos genes mitocondriais codificantes de proteínas de 42 espécies da ordem Hemiptera

Hederson Vinicius de SOUZA[1], Sandra Regina de Carvalho MARCHESIN[2], Mary Massumi ITOYAMA[1†].

[1]UNESP – Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]UNIP - Universidade Paulista, Campus Juscelino Kubitschek, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
[†]mary@ibilce.unesp.br

Palavras-chave: Gene Codificante de Proteína, Mitocôndria, Marcador Molecular, Filogenia.

Resumo: Muitos estudos têm utilizado o DNA mitocondrial para estudos evolutivos. Com essa crescente disponibilidade de sequências nucleotídicas encontradas nos bancos de dados, tem-se atualmente a possibilidade de explorar suas características, a fim de auxiliar a busca de novos marcadores moleculares para inferências evolutivas. Assim, esse estudo foi realizado com as sequências completas obtidas no banco de dados do NCBI dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas de 42 espécies da ordem Hemiptera. O genoma mitocondrial completo dessas espécies apresentou em média 15.623 bases. Dessas, 70,28% corresponderam aos genes codificantes de proteínas, os quais apresentaram em média 10.984,07 bases. O gene *COI* apresentou 35,48% (551) dos sítios conservados, sendo o mais conservado do genoma mitocondrial da ordem Hemiptera. Outros genes, também conservados, foram o *CYTB* e o *COII* apresentando, respectivamente, 289 (25,4%) e 162 (21,86%). Os genes *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND6* e *COIII* destacaram-se por apresentarem mais de 90% de seus sítios como variáveis. Em média, para ordem Hemiptera foi encontrado 75,82% de nucleotídeos AT. Dos resíduos de aminoácidos analisados, o gene *COI* apresentou o maior número de sítios conservados. Este trabalho sugere que análises para inferências evolutivas em agrupamentos mais inclusivos podem ser mais representativas com o uso dos genes do complexo I NADH desidrogenase, em especial o gene *ND5*, que nas análises filogenéticas de neighbor-joining obteve uma média de bootstrap de 73,37% e menor formação de agrupamentos parafiléticos. De forma geral, pode-se observar que o uso dos resíduos de aminoácidos apresentaram menores médias nos valores de bootstraps.

Introdução

A crescente disponibilidade de sequências de DNA em bancos de dados públicos e os avanços da Bioinformática vêm permitindo o desenvolvimento de novas abordagens e estratégias para a análise de sequências por meio da Genômica Comparativa, que foca o estudo das diferenças e similaridades na estrutura e organização dos genomas em diferentes organismos (PRIMROSE; TWYMAN, 2003).

Muitos estudos utilizam o DNA mitocondrial que é uma molécula de fita dupla circular que codifica, aproximadamente, 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. O conteúdo em termos de genes é extremamente conservado, contudo, algumas diferenças nos nucleotídeos são relatadas quando comparados organismos que divergem há muito tempo, como entre ordens (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Outra característica que torna a molécula de DNA mitocondrial muito atrativa para estudos evolutivos é o fato de ela ser citoplasmática, de modo que não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação. Uma terceira característica fundamental dessa molécula é a sua alta taxa de evolução: 10 vezes superior a um gene de cópia única nuclear (CORNELI; WARD, 2000; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Sequências parciais de genes mitocondriais de várias espécies têm sido utilizadas como marcadores para análises filogenéticas e identificação de espécies. Por exemplo, o gene *COI* tem sido extensivamente utilizado para identificação de espécies nos projetos de "DNA barcoding" (RATASINGHAM; HEBERT, 2007; KRESS; ERICKSON, 2008). Em particular, em Hexapoda, projetos de "DNA barcoding" têm sido conduzidos para abranger múltiplas ordens (HAJIBABAEI et al., 2006; PFENNINGER et al., 2007; NELSON et al., 2007; STAHLS; SAVOLAINEN, 2008), resultando em, pelo menos, 50.000 sequências parciais do loci *COI* no NCBI. Contudo, as análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais são frequentemente limitadas a espécies proximamente relacionadas, devido a sua alta taxa de substituição de nucleotídeos. Esse problema pode ser contornado com análise de variações nos conteúdos gênicos mitocondriais e dos rearranjos genéticos, que têm sido utilizados para elucidar relações evolutivas entre espécies relacionadas e distantes evolutivamente, baseada em características compartilhadas e derivadas que retomam a um ancestral comum que originou o grupo (BOORE et al., 1995).

Com essa crescente disponibilidade de sequências nucleotídicas encontradas nos bancos de dados, há a possibilidade de buscar marcadores inéditos para interpretações evolutivas. Assim, o presente trabalho propôs um estudo *in silico* das sequências

mitocondriais codificantes de proteínas com foco em seu potencial discriminativo para ser utilizado como marcadores filogenéticos em espécies da ordem Hemiptera.

Material e Métodos

As sequências do genoma mitocondrial completo de 42 espécies da ordem Hemiptera foram obtidas através do banco de dados do NCBI pelo site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, sendo classificadas de acordo com a taxonomia de cada espécie presente neste site (Tabela 1). Dessas sequências foram extraídos os 13 genes codificantes de proteína (GCP). Esses GCP estudados fazem parte dos complexos ATP sintase (genes *ATP 6* e *ATP 8*), do complexo IV (genes Citocromo oxidase subunidade I, II e III), do complexo III (gene citocromo b redutase) e do complexo I NADH desidrogenase (genes *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* e *ND6*). Esses genes foram alinhados com o programa CLUSTALW, utilizando análise visual para uma melhor adequação do alinhamento. As análises descritivas das sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos foram obtidas através do programa MEGA5. As análises filogenéticas de neighbor-joining foram feitas com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011), utilizando o modelo Kimura 2-Parâmetros para a análise dos nucleotídeos, o qual tem sido utilizado em estudos de DNA mitocondrial Barcoding (HEBERT et al., 2003a, b; BALL et al., 2005; HAJIBABAEI et al., 2006). Já para as análises dos resíduos de aminoácidos foi utilizado o modelo de Poisson. As análises de máxima parcimônia foram realizadas com o programa Phylip v.3.67 (FELSENSTEIN, 1993). Para as inferências evolutivas de máxima verossimilhança foi utilizado o programa PhyML (GUINDON et al., 2010). Devido às características intrínsecas de cada gene analisado, foi utilizado o modelo julgado mais adequado para cada um dos GCP, obtido através do programa MEGA5, mostrado na Tabela 2. Todas as análises filogenéticas foram feitas utilizando bootstrap de 1000 réplicas e comparação "pairwise".

As árvores obtidas para cada gene foram analisadas levando em consideração as médias dos bootstraps obtidos em cada um dos ramos nas topologias formadas.

Resultados

O genoma mitocondrial completo das 42 espécies da ordem Hemiptera analisadas (Tabela 1) apresentaram em média 15.623 pares de bases. Desses, 70,31%

correspondem aos GCPs, os quais apresentaram em média 10.984,07 pares de bases (Tabela 2).

O gene *ATP8* foi o menor gene, considerando o número de nucleotídeos, possuindo apenas uma média de 156,57 nucleotídeos. Já o maior, *ND5* apresentou 1.690,67 nucleotídeos (Tabela 2). Quando se considera o número de sítios conservados, o gene *ATP8*, foi o menos conservado, com apenas sete (3,18%) nucleotídeos. Já o gene *COI*, apresentou 551 (35,48%) sítios conservados. Pode-se verificar que o *CYTB* e *COII* também são genes conservados para a ordem Hemiptera, apresentando respectivamente 289 (25,04%) e 162 (21,86%).

Levando-se em consideração os sítios parcimoniosos, foi verificado que os genes *ND2*, *ND3*, *ND6* e *COIII* destacaram-se por apresentarem maior quantidade de sítios parcimoniosos, sendo respectivamente de 921 (87,22%), 327 (87,20%), 476 (85,46%) e 694 (86,21%) de sítios parcimoniosos. Quando se considera a porcentagem de sítios únicos, pode-se verificar que os genes *ATP8*, *ND1* e *ATP6* apresentaram 25 (11,36%), 95 (9,65%) e 51 (7,32%) (Tabela 2).

Quando se analisa a composição nucleotídica levando em consideração cada nucleotídeo, verifica-se que a adenina é a que se apresenta em maior frequência com média de 41,66%. O gene *ND4L* foi o que teve maior conteúdo com bases de adenina (52,23%) e o gene *COI* apresentou o menor (32,17%). O nucleotídeo com menor frequência foi a guanina com média de 10,30%, sendo encontrado em menor frequência no gene *ATP8* (6,75%) e maior no *COI* (15,15%) (Tabela 2). Dessa forma, em uma análise considerando as bases AT e CG, verificamos que a média dos genes analisados apresentou de 75,82% de nucleotídeos AT. O gene com maior conteúdo AT foi o *ATP8* e *ND6*, com respectivamente 81,40% e 80,53% dos totais de sítios, enquanto que os com menor conteúdo AT foram os genes *COIII* e *CYTB* com respectivamente 71,29% e 71,78% dos sítios analisados (Tabela 2).

A análise da razão transição pela transversão mostrou que o gene *COI* apresenta o valor mais alto (0,70), enquanto que *ATP8* apresentou o mais baixo (0,36) (Tabela 2).

Os resíduos de aminoácidos analisados no presente trabalho apresentaram um total médio de 3.655,76. Os genes com maiores números de resíduos foram o *ND5* e *COI*, com uma média de 563,19 e 511,29 aminoácidos, respectivamente (Tabela 2).

Dos resíduos de aminoácidos analisados, o gene *COI* apresentou o maior número de sítios conservados, tanto em números absolutos quanto em porcentagem, sendo

de 198 (38,30%), seguido do gene *CYTB* e *COIII* com respectivamente 102 (26,70%) e 57 (21,51%). Levando em consideração o número de sítios parcimoniosos, os genes do complexo I NADH desidrogenase apresentaram as maiores médias, sendo que o gene *ND2* apresentou a maior porcentagem 307 (88,73%). O gene com menos sítios parcimoniosos, em porcentagem, foi o *COI*, com 46,23% de seu conteúdo, representando 239 (46,23%) sítios. Em números absolutos, o gene *ATP8* apresentou o menor número, de 49 (56,32%). A análise dos sítios únicos revelou que o gene *COI* possuiu o maior número (77 - 14,89%), já o gene *ND1* apresentou a maior porcentagem (53 - 16,41%) dos seus sítios como sendo únicos. O gene com menor número de sítios únicos foi o *ATP8* e *ND3* com respectivamente quatro (4,60%) e 5 (4,20%) (Tabela 2).

Na análise da disposição dos genes codificantes de proteína do genoma mitocondrial, foi verificado que todas as espécies apresentaram a ordem *COI*, *COII*, *ATP8*, *ATP6*, COIII, *ND3*, *ND5*, *ND4*, *ND4L*, *ND6*, *CYTB*, *ND1*, *ND2* (Figura 1a), exceto para as espécies pertencentes à subfamília Aleyrodinae, isto é, *Bemisia tabaci*, *Neomaskellia andropogonis* e *Tetraleurodes acaciae*, as quais mostraram um rearranjo envolvendo os genes *ND3* e *COIII* (Figura 1b), sendo que ambos os genes foram encontrados entre os genes *ND1* e *ND2*. Na espécie *Aleurochiton aceris*, apresentou ainda, uma disposição dos genes igual a das espécies de sua subfamília (Aleyrodinae), exceto pela posição dos genes *ND3* e *COIII*, que foram encontrados entre *CYTB* e *ND1* (Figura 1c). A única exceção dessa subfamília a não apresentar rearranjos dos genes foi a espécie *Trialeurodes vaporariorum*, na qual ordem foi igual das demais espécies (Figura 1a).

Para as análises filogenéticas feitas com todos os nucleotídeos dos 13 genes, analisados em conjunto, apresentaram bootstraps com valor médio de 73,16%, 86,19% e 90,15% nos ramos das topologias geradas para, respectivamente, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e neighbor-joining (Figura 2 - neighbor-joining). Quando se analisou os valores dos bootstraps através dos resíduos de aminoácidos, obteve-se os valores médios de 79,48%, 86,19% e 83,67%, para respectivamente, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e neighbor-joining (Tabela 3). Nas topologias geradas para cada um dos genes, na análise de máxima parcimônia, foi verificado que o gene *ND5* apresentou uma média de bootstraps de 72,02%, o *ND2* com uma média de 67,86% e o *ND4* com 67,72%. Levando em consideração os resíduos de aminoácidos, o gene *ND2* apresentou 64,47%, *ND4* 57,89% e *ND5* com 56,09%. Já para a análise de máxima verossimilhança utilizando os nucleotídeos dos genes, foram encontrados os valores médios de bootstraps de 69,37%,

66,43% e 65,01% para respectivamente *ND5*, *ND4* e *ND2*. Quando se analisa os resíduos de aminoácidos, foram verificados os valores médios de 61,08%, 59,52% e 58,76% para os genes *ND4*, *ND5* e *ND2*. Nas análises dos genes pelo método de neighbor-joining obteve-se como resultados médios os valores de bootstraps de 75,28%, 73,37% e 72,53% para os genes *ND2*, *ND5* e *ND4*, respectivamente, sendo que o gene *COI* apresentou 63,99%. Quando se analisou os resíduos de aminoácidos, foram encontrados os valores médios de 61,50%, 60,22% e 57,63% para respectivamente *ND5*, *ND2* e *ND4* (Tabela 3).

Neste trabalho foi verificado que as reconstruções filogenéticas com os genes *ND2* (Figura 3) e *ND5* (Figura 4), cujas médias de bootstraps foram as mais altas, apresentaram parafilia entre as subordens estudadas (Heteroptera, Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha). Apenas o gene *COI* (Figura 5) apresentou monofilia entre essas subordens.

Discussão

De forma geral a maioria dos táxons apresentam no genoma mitocondrial dois genes ribossomais (RNAr), 22 RNA tansportadores (RNAt) e 13 genes codificantes de proteínas (WOLSTENHOLME, 1992). O genoma mitocondrial completo das 42 espécies da ordem Hemiptera analisadas apresentaram em média 15.623 bases. Dessas, 70,28% corresponderam aos genes codificantes de proteínas (GCP), os quais apresentaram em média 10.984,07 bases.

Alguns desses genes têm sido estudados como possíveis marcadores moleculares para diversos fins. O gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*COI*), por exemplo, foi escolhido para servir como base para um sistema de identificação global de animais, como um sistema de código de barras de DNA para a vida animal, conhecido como DNA barcoding, por possuir sequências nucleotídicas altamente conservadas, possibilitando o estudo comparativo dessas sequências entre espécies. A alta conservação da sequência do gene *COI* permite desenvolver oligonucleotídeos iniciadores (primers) universais com bastante sucesso (PALUMBI, 1996; TAUTZ et al., 2003; HEBERT et al., 2003). De fato, no presente estudo, o gene *COI* apresentou 35,48% (551) sítios conservados, sendo o mais conservado do genoma mitocondrial da ordem Hemiptera. Outros genes, também conservados, foram o *CYTB* e o *COII* apresentando respectivamente 289 (25,4%) e 162 (21,86%). Ambos os genes podem ser muito úteis ao analisar relações taxonômicas próximas, como gênero, contudo para níveis taxonômicos mais inclusivos é sugerida a

combinação com outros genes, também, mais conservados (MURAJI et al., 2000; MEMON et al. 2006).

Contudo, os sítios conservados não são informativos para uma análise filogenética. Os sítios informativos para tal análise são denominados sítios variáveis, ou seja, aqueles que efetivamente irão determinar a árvore filogenética. Neste estudo, pode-se verificar que os genes *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND6* e *COIII* destacarem-se por apresentarem maior quantidade de sítios variáveis, sendo mais de 90% de suas sequências compostas por sítios variáveis.

Em geral, o genoma mitocondrial de insetos tende a ter um alto conteúdo de nucleotídeos AT. Um estudo do genoma mitocondrial completo de *Drosophila yakuba* apontou a presença de 78,6% de nucleotídeos AT (CLERY; WOLSTENHOLME, 1985), enquanto que em abelhas foram observados 84,9% de nucleotídeos AT (CROZIER; CROZIER, 1993). Em média, para ordem Hemiptera foi encontrado 75,82% de nucleotídeos AT, sendo que o gene com maior conteúdo AT foi o *ATP8* e *ND6*, com respectivamente 81,40% e 80,53% dos totais de sítios, enquanto que os com menos conteúdo AT pode ser encontrado nos genes *COIII* e *CYTB* com respectivamente 71,29% e 71,78% dos sítios analisados. O motivo para as diferenças entre as frequências dos nucleotídeos AT, principalmente entre os genes de um mesmo organismo, ainda não está desvendado.

Quando a composição de bases é tendenciosa, a proporção de transversões (tv) para transições (ti) aumenta, podendo sugerir que múltiplos *hits* dentro dessa região do gene possa acontecer, fato que leva a redução da robustez das análises filogenéticas quanto mais divergente for o táxon (HOLMQUIST, 1983). A análise da razão transição/transversão mostrou que o gene *COIII* apresenta o valor mais alto, de 0,59, enquanto que *ATP8* apresentou o valor mais baixo de 0,36.

Nas sequências codificantes de proteínas, ainda, pode haver uma degeneração acentuada da terceira posição do códon, característica do código genético, podendo levar a saturação neste códon em níveis taxonômicos inclusivos. Para as espécies do gênero *Ips* (Coleoptera: Scolytidae), estudadas por Cognato e Sperling (2000), a saturação foi mais alta no terceiro códon, seguido pelo 1º e 2º códons, contudo neste gênero, o terceiro apresentou a maioria dos sítios filogeneticamente informativos e, portanto, os autores o utilizaram para relações filogenéticas. No entanto, a saturação por substituições de nucleotídeos pode diminuir o potencial de caracteres filogeneticamente informativos e, consequentemente, diminui a consistência filogenética (COGNATO; SPERLING, 2000). Para contornar esse

viés, alguns autores preferem utilizar resíduos de aminoácidos, porém a análise filogenética pode produzir árvores mal resolvidas, como verificado por Cognato e Sperling (2000).

Dos resíduos de aminoácidos analisados, o gene *COI* apresentou o maior número de sítios conservados, tanto em números absolutos quanto em porcentagem, sendo de 198 (38,30%) dos sítios conservados, seguido do gene *CYTB* e *COIII* com respectivamente 102 (26,70%) e 57 (21,51%). Esses sítios conservados diminuem as informações disponíveis para inferências filogenéticas uma vez que não são utilizados para análises evolutivas. Quando se considera o número de sítios parcimoniosos, utilizáveis nas inferências evolutivas, os genes do complexo I NADH desidrogenase apresentaram as maiores médias, sendo que o gene *ND2* apresentou a maior porcentagem 307 (88,73%). O gene com menos sítios parcimoniosos, em porcentagem, foi o *COI*, com 46,23% de seu conteúdo, representando 239 sítios. Em números absolutos, o gene *ATP8* apresentou o menor número, de 49 (56,32%).

Com exceção dos RNAts, a ordem dos genes presentes no genoma mitocondrial é, aparentemente, muito conservada entre os filos animais (WOLSTENHOLME, 1992). As comparações de diferentes rearranjos dos genes mitocondriais têm sido consideradas uma poderosa ferramenta para elucidar relações filogenéticas ancestrais (BOORE et al., 1995). Embora no presente estudo fossem considerados somente os rearranjos ocorridos apenas nos genes codificantes de proteinas, foi verificado que as espécies *Aleurochiton aceris, Bemisia tabaci, Neomaskellia andropogonis e Tetraleurodes acaciae* (Aleyrodinae) apresentaram um rearranjo envolvendo os genes *ND3* e *COI*, alterando sua posição no genoma, quando comparado a *Drosophila yakuba*, que é considerada como representante para o genoma mitocondrial em insetos (WOLSTENHOLME; CLARY, 1985). Na espécie *Aleurochiton aceris* ambos os genes localizaram-se entre os genes *CYTB* e *ND1*, enquanto que nas outras espécies da subfamlía Aleyrodinae estavam localizados entre os genes *ND1* e *ND3*. A espécie *Trialeurodes vaporariorum* foi a exceção dessa subfamília a apresentar rearranjo dos GCPs. Dessa forma, essa subfamília merece atenção especial no estudo dos rearranjos dos genes no genoma mitocondrial. A ordem dos genes tem sido utilizada para elucidar relações filogenéticas ao nível de superfamília (SHAO et al., 2001; THAO et al., 2004), contudo, quando se analisa a ordem dos GCPs, em Hemiptera, o rearranjo dos genes ocorre apenas na subfamília Aleyrodinae.

Desde o final da década de 90, sequências de DNA vêm sendo utilizadas como marcadores para inferir as relações evolutivas entre as diversas espécies biológicas (WOESE; FOX, 1977), para abordagens taxonômicas e para estudos de biodiversidade (TAUTZ et al., 2002).

O gene mitocondrial citocromo oxidase, subunidade 1 (*COI*) é um dos marcadores mais populares utilizados em sistemática molecular. Partes desse gene estão sendo frequentemente empregadas para as reconstruções de filogenias. Além disso, *COI* está no foco de interesse atual, em especial sua porção 5' que é utilizada pelo Consórcio do DNA Barcoding (HEBERT et al., 2003; STOECKLE, 2003). A sequência de nucleotídeos dessa região, em particular, possui aproximadamente 640 nucleotídeos (FOLMER et al., 1994) e tem sido utilizada como o único código de identificação para várias espécies, visando facilitar a determinação correta dos espécimes e a descoberta de novas espécies (MORITZ; CÍCERO, 2004).

Vários estudos apontam que esse segmento pode ser utilizado de forma eficaz como um código de barras de DNA, bem como, para identificar várias espécies de animais, como borboletas ou peixes (HEBERT et al., 2003; WARD et al., 2009). Por isso, atualmente, está ocorrendo um crescente número de sequências depositadas no banco de dados DNA Barcoding (MONAGHAN et al., 2006). Além disso, caracteres moleculares inicialmente utilizados na identificação ou diagnósticos de espécies, como as depositadas em bancos de dados do DNA barcoding, muitas vezes são, posteriormente, incorporados em estudos com abordagens filogenéticas e/ou filogeográficas. Por isso, é importante estudar como as alterações, nas informações filogenéticas, mudam em níveis cada vez mais inclusivos (GALTIER et al., 2006). No trabalho, pudemos verificar que, embora o *COI* possua certas características para ser utilizado como marcador de identificação de espécies, como regiões altamente conservadas para confecção de primers universais, este pode não conferir uma resolução boa para inferências filogenéticas em níveis mais inclusivos. De fato, Li et al. (2005) sugeriram que o segmento de *COI* sozinho não poderia ser um marcador molecular ótimo para filogenia de Pentatomomorpha. Em nossas análises esse gene apresentou uma média de bootstraps nos ramos de 63,99%, contudo os agrupamentos das subordens foram monofiléticos. Para inferências evolutivas em agrupamentos mais inclusivos, pode ser mais representativa, também, com o uso dos genes do complexo I NADH desidrogenase, em especial o gene *ND5* que na análise de neighbor-joining, obteve-se uma média de bootstrap de 73,37% e menor formação de agrupamentos parafiléticos quando comparado com *ND2*,

por exemplo. De forma geral, pode-se observar que embora as sequências dos nucleotídeos dos genes codificantes de proteínas possam apresentar a 3ª base do códon degenerado, nas espécies analisadas o uso dos resíduos de aminoácidos apresentaram menores médias nos valores de *bootstraps*, o que pode indicar que, na Ordem Hemiptera, a saturação na 3ª base do códon não prejudicou a análise.

Dessa maneira, se faz necessário a exploração dos genes do complexo I NADH desidrogenase como potenciais marcadores nas análises evolutivas mais inclusivas.

Agradecimentos

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros.

Referências

ARIAS, M. C., INFANTE-MALCHIAS, M. E. **RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA** – In: MATIOLI, S. R. (Ed.) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 143-152.

BALL, S. L.; HEBERT, P. D. N.; BURIAN, S. K.; WEBB, J. M. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, p. 508-524, 2005.

BOORE, J. L.; COLLINS, T. M.; STANTON, D.; DAEHLER, L. L.; BROWN, W. M. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature**, v. 376, n. 6536, p.163-165, 1995.

CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, 22, 252–271, 1985.

COGNATO, A. I., SPERLING, F. A. H. Phylogeny of Ips DeGeer species inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 14, p. 445-460, 2000.

CORNELI, P. S.; WARD, R. H. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the reliability of branch length estimation. **Mol. Biol. Evol.** v. 17, n. 2, p. 224-34, 2000.

CROZIER, R. H.; CROZIER, C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organisation. **Genetics**. v. 133, p. 97–117, 1993.

FELSENSTEIN, J. 1993. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c**. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

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

GALTIER, N.; ENARD, D.; RANONDY, Y.; BAZIN, E.; BELKHIR, K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Res.** v. 16, p. 215–222, 2006.

GUINDON S, DUFAYARD J. F., LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDIJK W, GASCUEL O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol.** v. 59, p. 307-321, 2010.

HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v 103, p. 968-971, 2006.

HEBERT P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HOLMQUIST, R. Transitions and transversion in evolutionary descent: an approach to understanding. **Journal of Molecular Evolution**, v. 19, p 134-144, 1983.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. **PNAS**, v. 105, n. 8, 2761-2762, 2008.

LI, H. M.; DENG, R. Q.; WANG, J. W.; CHEN, Z. Y.; JIA, F. L.; WANG, X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 313-326, 2005.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos**. In: Sergio Russo Matioli. (Org.). Biologia molecular e evolução. 1 ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2001, v. 1, p. 153-161.

MEMON, N.; MEIR, R.; MANAN, A.; FENG-YI SU, K. On the use of DNA sequence for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bugs genus *Halys* (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. **Systematic Entomology**, v. 31, p. 703-710, 2006.

MONAGHAN, M. T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; INWARD, D. J. G.; LEES, D. C.; RANAIVOSOLO, R.; EGGLETON, P.; BARRACLOUGH, T. G.; VOGLER, A. P. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Syst Biol.** v. 58, p. 298–311, 2009.

MORITZ C., CICERO C. DNA barcoding: Promise and pitfalls. **PLoS Biol.** v. 2, p. 1529-1531, 2004.

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

NELSON, L. A.; J. F. WALLMAN & M. DOWNTON. Using *COI* barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 44-52, 2007.

PALUMBI, S. R. **Nucleic acids II: The polymerase chain reaction**. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) Molecular systematics. Sinauer Associates, Inc, pp. 205–247, 1996

PFENNINGER, M.; NOWAK, C.; KLEY, C.; STEINKE, D.; STREIT, B. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic Chironomus (Diptera) species. **Mol. Ecol.**, v. 16, n.9, p.1957-1968, 2007.

PRIMROSE, S. B.; TWYMAN, S. R. **Principles of Genome analysis and genomics**, 3 ed. Turin: Blackwell Publishing Company, 2003, 263p.

RATASINGHAM, S.; HEBERT P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System http://www.barcodinglife.org. **Mol Ecol Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

SHAO, R.; CAMPBELL, N. J. H.; SCHMIDT, E. R.; BARKER. S. C. Increased rate of gene rearrangement in the mitochondrial genomes of three orders of hemipteroid insects. **Mol. Biol. Evol.** v. 18, p. 1828–1832, 2001.

STAHLS, G.; SAVOLAINEN, E. MtDNA *COI* barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 46, n. 1, p. 82-87, 2008.

STOECKLE, M. Taxonomy, DNA and the bar code of life. **BioScience**, v. 53, p. 2–3, 2003.

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

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 70-74, 2003.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R.H.; VOGLER, A.P.. DNA points the way ahead in taxonomy. **Nature**, v. 418, p. 479, 2002.

THAO, M. L.; BAUMANN, L.; BAUMANN, P. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). **BMC Evol Biol.** v. 4, p. 25, 2004.

WARD, R. D.; HANNER, R. H.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 329–356, 2009.

WOESE, C.; FOX, G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution, pp. 173–216 in *Mitochondrial Genomes. International Review of Cytology*, Vol. 141, edited by D. R. Wolstenholme and K. W. Jeon. Academic Press, New York, 1992.

WOLSTENHOLME, D. R.; CLARY, D. O. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 109, n. 4, p 725–744, 1985.

Tabela 1. Classificação e referências das 42 espécies da ordem Hemiptera obtidas através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Subordem	**Infraordem**	**Superfamília**	**Família**	**Espécie**	**Referência**
Auchenorrhyncha	Fulgoromorpha	Fulgoroidea	Flatidae	*Geisha distinctissima* (Walker, 1858)	NC_012617
			Fulgoridae	*Lycorma delicatula* (White)	NC_012835
			Delphacidae	*Laodelphax striatellus* (Fallén 1806*)*	NC_013706
			Issidae	*Sivaloka damnosus* (Chou & Lu)	NC_014286
	Cicadomorpha	Cercopoidea	Cercopidae	*Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758)	NC_005944
		Membracoidea	Cicadellidae	*Homalodisca vitripennis* (Germar, 1821)	NC_006899
Heteroptera	Cimicomorpha	Cimicoidea	Anthocoridae	*Orius niger* (Wolff)	NC_012429
		Reduvioidea	Reduviidae	*Triatoma dimidiata* (Latreille)	NC_002609
				Valentia hoffmanni (China)	NC_012823
	Gerromorpha	Gerroidea	Gerridae	*Gerris sp.*	NC_012841
			Hydrometridae	*Hydrometra sp.*	NC_012842
	Leptopodomorpha	Saldoidae	Saldinae	*Saldula arsenjevi* (Vinokurov 1981)	NC_012463
	Nepomorpha	Ochteroidea	Gelastocoridae	*Nerthra sp.*	NC_012838
		Naucoroidea	Naucoridae	*Ilyocoris cimicoides* (Linnaeus 1758)	NC_012845
		Nepoidae	Nepidae	*Laccotrephes robustus* (Stal, 1871)	NC_012817
		Notonectoidae	Notonectidae	*Enithares tibialis* (Liu & Zheng 1991)	NC_012819
		Gelastocoroidea	Ochteridae	*Ochterus marginatus* (Latreille, 1804)	NC_012820
		Pleoidae	Pleidae	*Paraplea frontalis* (Fieber, 1844)	NC_012822
	Pentatomomorpha	Aradoidea	Aradidae	*Neuroctenus parus* (Hsiao)	NC_012459
		Coreoidea	Alydidae	*Riptortus pedestris* (Fabricius)	NC_012462
			Rhopalidae	*Aeschyntelus notatus* (Hsiao)	NC_012446
				Stictopleurus subviridis (Hsiao)	NC_012888
			Coreidae	*Hydaropsis longirostris* (Hsiao)	NC_012456
		Lygaeoidea	Berytidae	*Yemmalysus parallelus* (Stusak)	NC_012464
			Colobathristidae	*Phaenacantha marcida* (Horvath)	NC_012460
			Geocoridae	*Geocoris pallidipennis* (Costa)	NC_012424
			Malcidae	*Malcus inconspicuus* (Štys)	NC_012458
		Pentatomoidea	Cydnidae	*Macroscytus subaeneus* (Dallas)	NC_012457
			Plataspidae	*Coptosoma bifaria* (Montandon)	NC_012449
			Pentatomidae	*Halyomorpha halys* (Stål)	NC_013272
				Nezara viridula (Linnaeus)	NC_011755
		Pyrrhocoroidea	Largidae	*Physopelta gutta* (Burmeister)	NC_012432
			Pyrrhocoridae	*Dysdercus cingulatus* (Fabricius)	NC_012421
Sternorrhyncha	Aphidomorpha	Aphidoidea	Aphididae	*Schizaphis graminum* (Rondani)	NC_006158
				Acyrthosiphon pisum (Harris)	NC_011594
	Aleyrodiformes	Aleyrodoidea	Aleyrodidae	*Aleurochiton aceris* (Modeer, 1778*)*	NC_006160
				Aleurodicus dugesii (Cockerell, 1896)	NC_005939
				Bemisia tabaci (Gennadius, 1889)	NC_006279
				Neomaskellia andropogonis (Corbett, 1926)	NC_006159
				Tetraleurodes acaciae (Quaintance, 1900)	NC_006292
				Trialeurodes vaporariorum (Westwood, 1856)	NC_006280
	Psyllomorpha	Psylloidea	Psyllidae	*Pachypsylla venusta* (Osten-Sacken)	NC_006157

Tabela 2. Análise descritiva dos 13 genes codificantes de proteínas presentes no genoma mitocondrial das 42 espécies de Hemiptera.

	ATP6	*ATP8*	*COI*	*COII*	*COIII*	*CYTB*	*ND1*	*ND2*	*ND3*	*ND4*	*ND4L*	*ND5*	*ND6*	Total	Genoma
Comprimento médio (pb)	665,12	156,57	1.534,40	675,86	784,45	1.130,40	928,43	982,21	352,31	1.314,31	289,95	1.690,67	479,38	10.984,07	15.623,00
% do genoma completo	4,26%	1,00%	9,82%	4,33%	5,02%	7,24%	5,94%	6,29%	2,26%	8,41%	1,86%	10,82%	3,07%	70,31%	
Composição Nucleotídica															
N. sítios Total	697	220	1.553	741	805	1.154	984	1.056	375	1.381	329	1.827	557	11.640	
N. sítios Conservados	105 (15,06%)	7 (3,18%)	551 (35,48%)	162 (21,86%)	59 (7,33%)	289 (25,04%)	149 (15,14%)	54 (5,11%)	23 (6,13%)	151 (10,93%)	24 (7,29%)	196 (10,73%)	15 (2,69%)	1.754 (15,07%)	
N. sítios Variáveis	585 (83,93%)	180 (81,82%)	998 (64,26%)	540 (72,87%)	745 (92,55%)	856 (74,18%)	826 (83,94%)	978 (92,61%)	349 (93,07%)	1.215 (87,98%)	301 (91,49%)	1574 (86,16%)	514 (92,28%)	9.623 (82,67%)	
N. sítios Parcimoniosos	534 (76,61%)	149 (67,73%)	914 (58,85%)	494 (66,67%)	694 (86,21%)	784 (67,94%)	727 (73,88%)	921 (87,22%)	327 (87,20%)	1.116 (80,81%)	274 (83,28%)	1456 (79,69%)	476 (85,46%)	8.872 (76,22%)	
N. sítios Únicos	51 (7,32%)	25 (11,36%)	81 (5,22%)	43 (5,80%)	51 (6,34%)	72 (6,24%)	95 (9,65%)	55 (5,21%)	22 (5,87%)	94 (6,81%)	24 (7,29%)	111 (6,08%)	30 (5,39%)	737 (6,33%)	
														Média	
% A	36,54	43,67	32,17	37,49	36,24	34,06	49,85	39,98	39,18	50,15	52,23	49,24	40,84	41,66	
% T	38,24	37,73	36,54	34,61	35,05	37,72	26,20	38,95	37,91	26,95	26,19	28,23	39,68	34,16	
% C	14,93	11,85	16,14	15,30	15,48	15,80	14,39	11,95	13,01	13,45	13,64	13,03	11,44	13,88	
% G	10,29	6,75	15,15	12,59	13,23	12,42	9,56	9,12	9,90	9,44	7,95	9,50	8,03	10,30	
% AT	74,78	81,40	68,71	72,11	71,29	71,78	76,05	78,92	77,09	77,11	78,42	77,47	80,53	75,82	
% CG	25,22	18,60	31,29	27,89	28,71	28,22	23,95	21,08	22,91	22,89	21,58	22,53	19,47	24,18	
Si/Sv	0,49	0,36	0,70	0,64	0,59	0,66	0,47	0,42	0,49	0,41	0,44	0,41	0,42		
Modelo de substituição (nucleotídeo)	TN93+G+I	T92+G+I	GTR+G+I	GTR+G+I	TN93+G	TN93+G+I	TN93+G+I	TN93+G+I	GTR+G	GTR+G+I	GTR+G	T92+G+I	TN93+G	TN93+G+I	
Gamma (G)	1.05	1.46	1.24	1.26	0.72	0.97	1.01	1.28	0.78	1.26	0.92	1.03	1.08	1.03	
Invariable Sites (i)	0.14	0.03	0.34	0.22	n/a	0.23	0.12	0.06	n/a	0.10	n/a	0.11	n/a	0.15	
														Total	
Comprimento médio (aa)	221,21	51,52	511,29	225,12	261,21	376,48	308,81	327,10	116,98	437,67	96,00	563,19	159,19	3.655,76	
Composição dos Resíduos Aminoacídicos															
N. sítios Total	241	87	517	245	265	382	323	346	119	453	106	598	208	3.845	
N. sítios Conservados	25 (10,37%)	1 (1,15%)	198 (38,30%)	60 (24,49%)	57 (21,51%)	102 (26,70%)	24 (7,43%)	16 (4,62%)	14 (11,76%)	40 (8,83%)	3 (2,83%)	57 (9,53%)	3 (1,44%)	592 (15,40%)	
N. sítios Variáveis	207 (85,89%)	54 (62,07%)	317 (61,32%)	171 (69,80%)	206 (77,74%)	278 (72,77%)	298 (92,26%)	323 (93,35%)	104 (87,39%)	410 (90,51%)	99 (93,40%)	525 (87,79%)	180 (86,54%)	3.178 (82,65%)	
N. sítios Parcimoniosos	179 (74,27%)	49 (56,32%)	239 (46,23%)	154 (62,86%)	192 (72,45%)	250 (65,45%)	243 (75,23%)	307 (88,73%)	99 (83,19%)	381 (84,11%)	94 (88,68%)	488 (81,61%)	160 (76,92%)	2.845 (73,99%	
N. sítios Únicos	28 (11,62%)	4 (4,60%)	77 (14,89%)	16 (6,53%)	13 (4,91%)	28 (7,33%)	53 (16,41%)	15 (4,34%)	5 (4,20%)	27 (5,96%)	5 (4,72%)	35 (5,85%)	11 (5,29%)	312 (8,11%)	
Modelo de substituição (aminoácido)	mtREV24+G+F	JTT+G+F	mtREV24+G+I	mtREV24+G+I	mtREV24+G+F	mtREV24+G+I+F	mtREV24+G+F	mtREV24+G+I+F	mtREV24+G+I+F	mtREV24+G+F	mtREV24+G+F	WAG+G+I+F	JTT+G+F	mtREV24+G+I+F	
Gamma (G)	0.64	2.05	0.69	1.38	0.62	0.97	0.82	1.79	1.35	0.73	1.40	1.03	1.07	0.86	
Invariable Sites (i)	n/a	n/a	0.25	0.22	n/a	0.19	n/a	0.04	0.07	n/a	n/a	0.10	n/a	0.11	

Tabela 3. Valores médios, mínimos e máximos dos bootstraps encontrados nos nós dos ramos das relações filogenéticas de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e neighbor-joining dos nucleotídeos e resíduos de aminoácidos.

	Máxima Parcimônia						Máxima Verossimilhança						Neigbor-Joining					
	Nucleotídeos			Aminoácidos			Nucleotídeos			Aminoácidos			Nucleotídeos			Aminoácidos		
CDS	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Mínimo**	**Máximo**
ATP6	45,58%	2,40%	100,00%	41,84%	3,60%	100,00%	43,96%	2,20%	100,00%	39,27%	1,40%	100,00%	50,14%	6,40%	100,00%	43,41%	0,40%	100,00%
ATP8	42,01%	3,40%	100,00%	34,56%	0,10%	100,00%	33,05%	1,30%	96,70%	32,19%	0,00%	92,10%	35,11%	1,30%	98,60%	24,81%	0,50%	64,30%
COI	56,96%	5,70%	100,00%	49,19%	6,40%	100,00%	62,18%	12,20%	100,00%	51,76%	3,60%	100,00%	63,99%	11,70%	100,00%	57,33%	8,20%	100,00%
COII	43,10%	3,20%	100,00%	46,96%	4,20%	100,00%	40,63%	1,70%	100,00%	47,80%	3,70%	100,00%	45,32%	1,60%	100,00%	51,59%	5,70%	100,00%
COIII	46,18%	3,50%	100,00%	42,34%	11,00%	100,00%	42,56%	6,70%	100,00%	44,40%	9,00%	100,00%	38,03%	1,40%	100,00%	48,85%	17,00%	100,00%
CYTB	47,23%	1,80%	100,00%	51,31%	6,80%	100,00%	51,11%	6,40%	100,00%	52,84%	8,10%	100,00%	54,59%	7,40%	100,00%	52,53%	5,20%	100,00%
ND1	50,08%	10,10%	100,00%	45,15%	3,90%	100,00%	50,12%	5,00%	100,00%	48,41%	5,50%	100,00%	55,51%	20,10%	100,00%	52,13%	8,90%	100,00%
ND2	67,86%	13,10%	100,00%	64,47%	12,90%	100,00%	65,01%	4,10%	100,00%	58,76%	10,70%	100,00%	75,28%	22,00%	100,00%	60,22%	16,10%	100,00%
ND3	45,72%	1,90%	100,00%	39,09%	3,10%	100,00%	36,64%	2,70%	100,00%	35,75%	2,10%	99,60%	33,41%	1,20%	100,00%	36,62%	0,50%	100,00%
ND4	67,72%	18,90%	100,00%	57,89%	11,60%	100,00%	66,43%	20,60%	100,00%	61,08%	2,70%	100,00%	72,53%	25,30%	100,00%	57,63%	10,50%	100,00%
ND4L	51,00%	5,10%	100,00%	44,60%	3,80%	100,00%	40,87%	3,40%	99,60%	36,68%	1,40%	100,00%	46,00%	1,90%	99,90%	35,74%	0,90%	100,00%
ND5	72,02%	28,40%	100,00%	56,09%	13,50%	100,00%	69,37%	18,20%	100,00%	59,52%	6,80%	100,00%	73,37%	26,60%	100,00%	61,50%	6,40%	100,00%
ND6	55,083	8,30%	100,00%	45,37%	6,30%	100,00%	43,10%	2,20%	100,00%	41,08%	2,40%	99,80%	46,24%	0,20%	99,80%	40,11%	2,80%	100,00%
Todos Genes	73,16%	23,70%	100,00%	79,48%	21,50%	100,00%	86,19%	37,10%	100,00%	81,96%	18,20%	100,00%	90,15%	42,80%	100,00%	83,67%	29,10%	100,00%

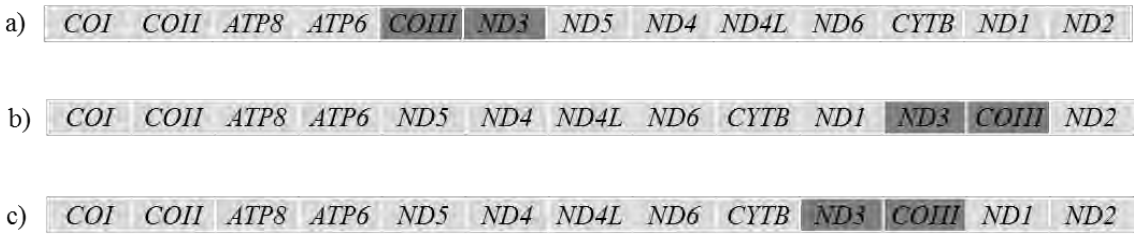

Figura 1. Disposição dos 13 genes codificantes de proteínas das 42 espécies da ordem Hemiptera. a) Disposição dos genes prevalentes na maioria das espécies; b) disposição dos genes encontrada para as espécies *Bemisia tabaci*, *Neomaskellia andropogonis* e *Tetraleurodes acaciae*; c) disposição dos genes na espécie *Aleurochiton aceris*. Região destacada refere-se aos genes com rearranjo.

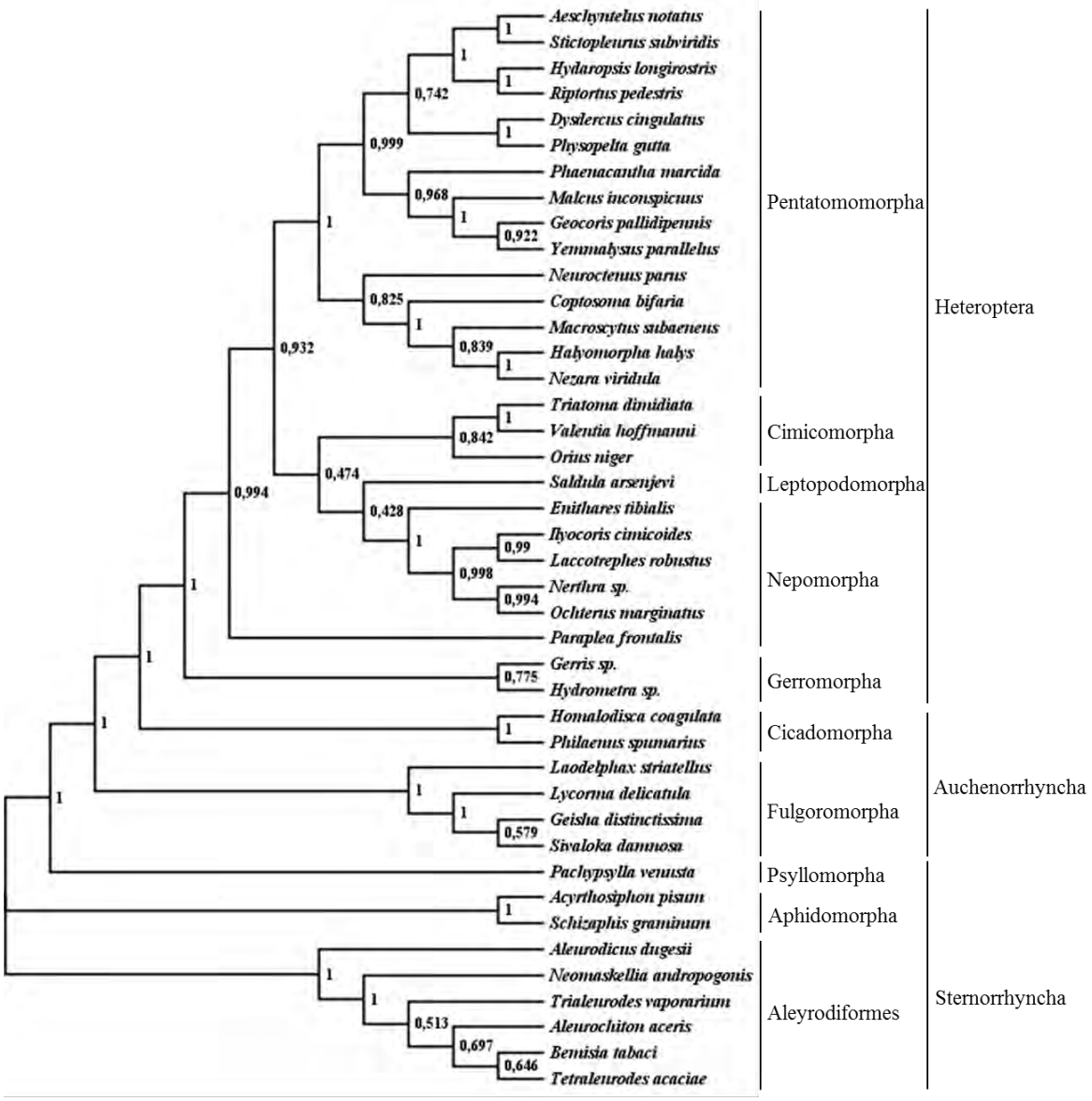

Figura 2. Relacionamento filogenético das 42 espécies de Hemiptera, utilizando os nucleotídeos concatenados dos 13 genes codificantes de proteínas, pelo método de neighbor-joining utilizando como modelo de distância Kimura 2-parâmetros. Árvore consenso não enraizada.

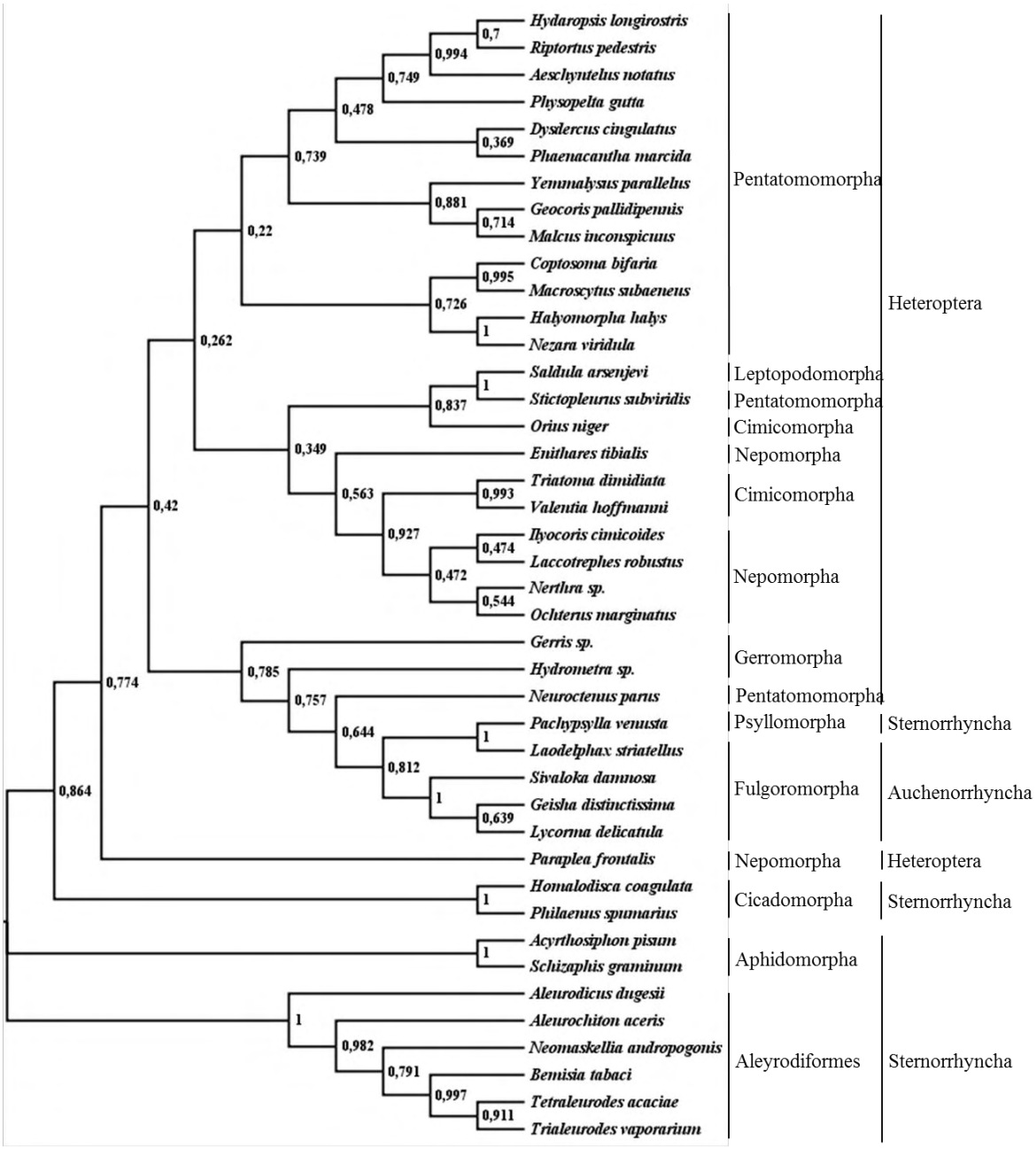

Figura 3. Relacionamento filogenético das 42 espécies de Hemiptera, utilizando os nucleotídeos do gene NADH desidrogenase (*ND2*), pelo método de neighbor-joining utilizando como modelo de distância Kimura 2-parâmetros. Árvore consenso não enraizada.

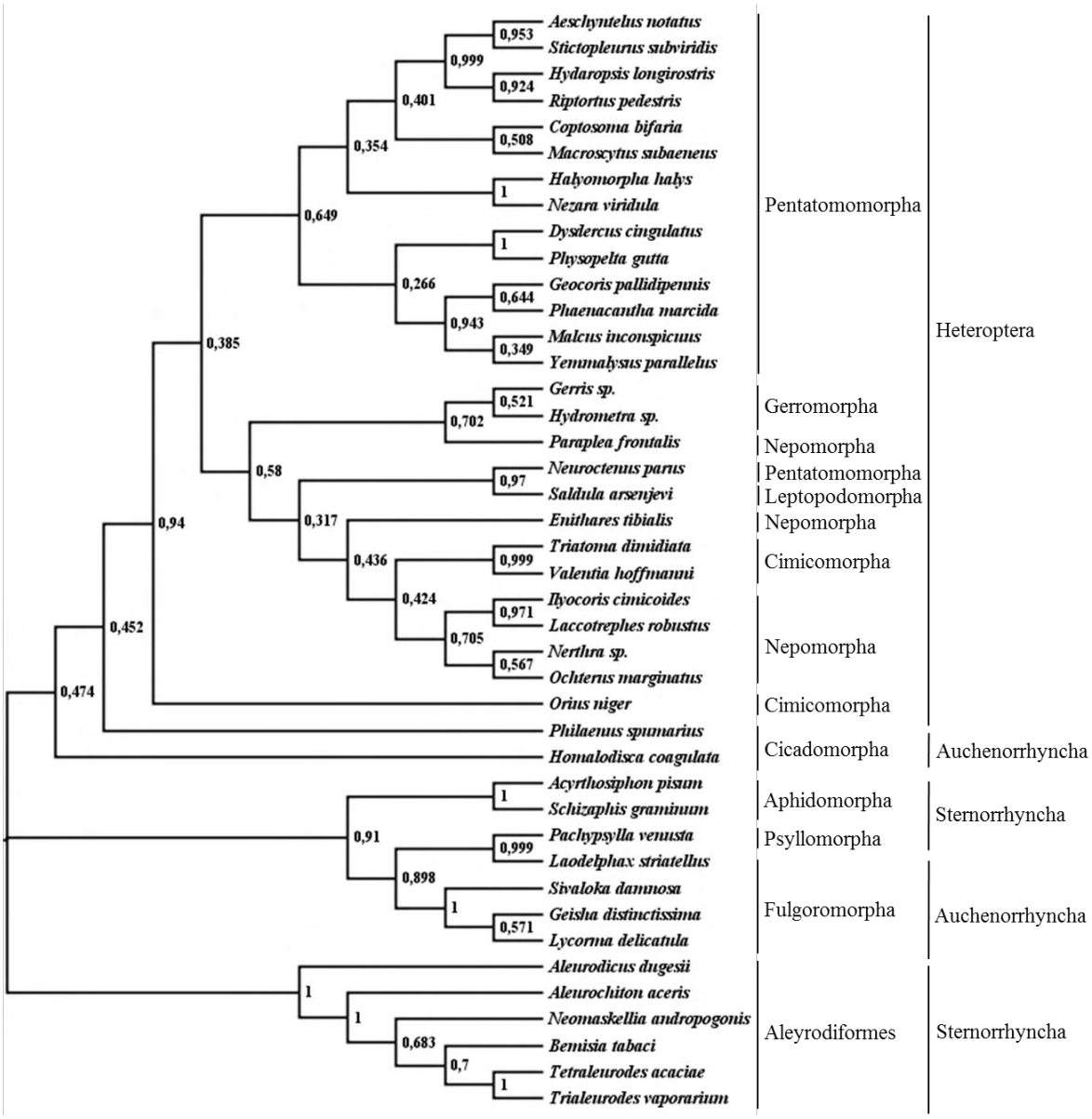

Figura 4. Relacionamento filogenético das 42 espécies de Hemiptera, utilizando os nucleotídeos do gene NADH desidrogenase (*ND5*), pelo método de neighbor-joining utilizando como modelo de distância Kimura 2-parâmetros. Árvore consenso não enraizada.

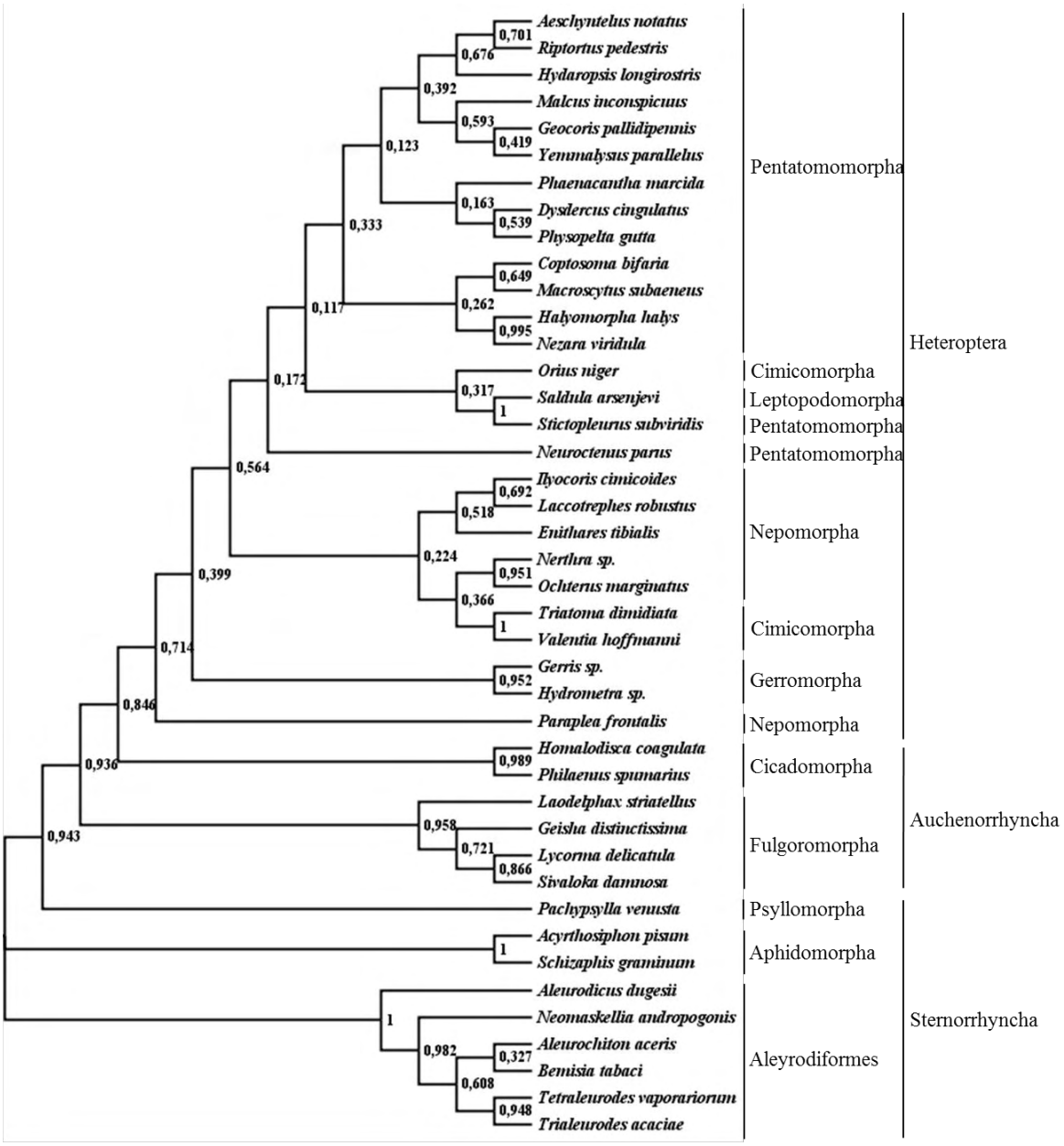

Figura 5. Relacionamento filogenético das 42 espécies de Hemiptera, utilizando os nucleotídeos do gene citocromo oxidase I (*COI)*, pelo método de neighbor-joining utilizando como modelo de distância Kimura 2-parâmetros. Árvore consenso não enraizada.

VIII. DISCUSSÃO GERAL

A análise comparativa de sequências de nucleotídeos está se mostrando cada vez mais importante como uma ferramenta para compreender os mecanismos e a história da evolução molecular e deduzir as similaridades e diferenças na organização gênica entre espécies de interesse (SCHWARTZ et al., 2000).

Diferenças nas sequências de nucleotídeos de porções de várias regiões mitocondriais foram utilizadas para gerar informações sobre a estrutura populacional e/ou relações filogenéticas de várias espécies de insetos (XIONG; KOCHER, 1991; GASPARICH et al., 1995; ZHANG et al., 1995; BESANSKY et al., 1997; LEHMANN et al., 2000). Em nosso trabalho, também analisamos regiões diferentes de um mesmo gene, as regiões 1, 2 e 3 do citocromo oxidase I, apresentados de forma independentes para as famílias Coreidae e Pentatomidae. Contudo, os resultados foram semelhantes para essas famílias com relação à descrição nucleotídica e a taxa de divergência, sugerindo que este gene evoluiu de modo similar para ambas as famílias analisadas.

Com relação às análises das reconstruções filogenéticas utilizando essas três regiões, foram verificadas baixas consistências entre os ramos, que podem ser devidas à divergência das espécies que não permite recuperar a história evolutiva no nível taxonômico de família. Torna-se, portanto, imprescindível analisar outros genes que sejam informativos para esse nível, nestas espécies, visando recuperar a história evolutiva de um modo robusto para a maioria dos ramos. Fato que Li et al. (2005) já havia sugerido que o segmento do *COI* sozinho não poderia ser um marcador molecular ótimo para filogenia de Pentatomomorpha. No nível de família, a região 1 (correspondente ao DNA barcoding) raramente suporta resolução satisfatória (BROWN et al., 1994;. MIURA et al., 1998), e muitas vezes revela-se pouco confiável (DOWTON; AUSTIN, 1997; MARDULYN; WHITFIELD, 1999), ao passo que em níveis taxonômicos ainda mais inclusivos, sequências do citocromo oxidase I não são adequados para a resolução de relacionamentos evolutivos (LIU; BECKENBACH, 1992; HOWLAND; HEWITT, 1995; FRATI et al., 1997).

Não apenas a região 1, mas as três regiões analisadas neste trabalho não foram capazes de, sozinhas ou concatenadas, resolverem com robustez uma inferência filogenética das famílias analisadas. Assim, esse trabalho evidencia que as

regiões do mesmo gene podem apresentar comportamentos diferentes para cada família e que a adição de outras regiões do mesmo gene pode não ser necessária ou muitas vezes podem prejudicar as análises.

A pequena subunidade nuclear ribosomal 18S, além de ser útil para inferências em táxons menos inclusivos, fornece sequências obtidas rapidamente, sendo fácil para desenhar primers (KJER, 1995; WOESE, 1987). Alguns estudos têm utilizado com sucesso a sequência parcial ou completa desse gene para examinar relações evolutivas entre as linhagens mais inclusivas de Hemiptera (WHEELER et al., 1993; CAMPBELL et al., 1995; SORENSEN et al., 1995). É interessante observar que, embora o gene 18S, utilizado como marcador em nosso trabalho, apresentasse poucos sítios analisáveis, estes formaram cenários evolutivos com menos parafilias das tribos quando comparado com o gene 16S.

O gene ribosomal 16S tem sido utilizado para relações filogenéticas em diversos níveis taxonômicos de invertebrados (SIMON et al., 1994). Contudo, devido seu baixo nível de divergência, esse gene pode falhar ao analisar as relações taxonômicas para gênero, mas pode ser muito útil para relações taxonômicas de táxons mais distantes, como famílias (MURAJI et al., 2000). Quando as sequências de nucleotídeos de ambos os marcadores, genes 16S e 18S, foram concatenadas, houve diminuição da parafilia entre as tribos, como ocorreu para a família Coreidae, mostrando que as informações dos marcadores somaram-se, deixando as análises mais confiáveis. Contudo, para a família Pentatomidae foi observado o oposto.

Quando os três genes, COI, 16S e 18S foram concatenados, as informações puderam-se somar deixando as análises mais robustas. Com a reconstrução filogenética gerada a partir dos fragmentos desses genes foi possível inferir a evolução dos aspectos dos lobos testiculares e dos cariótipos das famílias Coreidae e Pentatomidae. Por exemplo, foi verificado que na família Coreidae há prevalência da bainha peritoneal com pigmentação avermelhada que está presente nas espécies derivadas, como nas tribos Leptoscelini e Anisoscelidini, podendo ser encontrado as bainhas com pigmentos alaranjados e amarelados, os quais podem ser pertencentes às espécies que se divergiram primeiro como *Zicca annulata*. Em Pentatomidae foi verificado que a bainha peritoneal com pigmentação avermelhada está distribuída de maneira heterogênea pela filogenia, sendo representada nas espécies basais (como em

Platycarenus umbraculatus) e nas derivadas (como na tribo Carpocorini). As espécies da família Pentatomidae podem, ainda, apresentar duas membranas pigmentadas, que podem ser de mesma cor (amarela), ou de cores diferentes (externa amarelada e interna avermelhada) ou ambas de mesma cor (amarelada ou avermelhada) (SOUZA et al., 2011). As espécies formadas por duas membranas amareladas não se agruparam. Devido ao cenário evolutivo mostrar uma distribuição heterogênea desse caráter, em ambas as famílias é possível inferir que as pigmentações podem ser perdidas de modo independente entre as espécies.

Outra característica peculiar em Heteroptera são os testículos divididos por um tecido conectivo em subunidades denominadas de lobos. O número mais comum é sete, embora haja variações entre tribos e espécies (NICKLAS, 1961; REBAGLIATI et al., 2005). Na família Coreidae, por exemplo, foi verificado que o número modal é sete. O cenário evolutivo desse caráter, contudo, foi controverso. A espécie *Zicca annulata*, foi considerada basal e apresentou apenas quatro lobos testiculares. Os representantes do grupo externo apresentaram seis lobos testiculares, contudo alguns membros dessa família foram reportados apresentando sete lobos testiculares, como *Platycarenus umbraculatus*, *Chlorocoris complanatus* e *Loxa deducta* (SOUZA; ITOYAMA, 2011; SOUZA et al., 2011). Já no cenário evolutivo analisado neste trabalho envolvendo o número de lobos testiculares em Pentatomidae, foi possível propor que houve redução no número de lobos testiculares na evolução destas espécies. Neste cenário há algumas exceções como *Antiteuchus tripterus* que possui seis lobos e está inserida no agrupamento das espécies com sete. Contudo, Souza et al. (2007) encontraram um lobo internalizado em outro lobo testicular, o que pode sugerir outro modo evolutivo para diminuição do número dos lobos testiculares.

Neste trabalho foi possível verificar que a evolução de espermatozoides não fertilizante não é homogênea. A presença do lobo *harlequin* e células polimégalas nas espécies que divergiram primeiro, corrobora a hipótese de Souza et al. (2011) sobre a existência de pré-adaptação para a formação de espermatozoides não fertilizantes neste lobo. Portanto, algumas espécies tiveram a redução do número de lobos, como as do gênero *Oebalus*, ou para a formação de espermatozoides não fertilizantes como em *Antiteuchus tripterus* ou *Chlorocoris complanatus*.

De acordo com Jacobs (2004), como todos os Heteroptera apresentam cromossomos holocêntricos, fragmentos que se originam devido a quebras cromossômicas, geralmente movem-se regularmente para os polos durante a anáfase e sobrevivem por muitas gerações celulares. Fragmentação pode, portanto, levar facilmente ao aumento do número cromossômico. Da mesma maneira, fusão cromossômica é, também, teoricamente mais fácil em organismos com cromossomos holocêntricos, pois não ocorrem problemas associados com a formação de cromossomos dicêntricos. Em especial, a família Coreidae apresenta maior variedade cariotípica. Podemos constatar pelas análises apresentadas neste trabalho, que as espécies mais derivadas apresentaram o cariótipo 2n= 21 (18A+2m+X0), como as espécies das tribos Anisoscelidini e Leptoscelini, enquanto que *Zicca annulata*, espécie que divergiu primeiro, apresentou 2n= 23 (20A+2m+X0). As espécies *Anisoscelis foliacea* e *Chariesterus armatus*, 2n= 27 (24A+2m+X0), formaram agrupamentos parafiléticos com relação ao cariótipo. Neste contexto pode-se observar que fusões e fissões cromossômicas podem ocorrer, sem que haja um padrão evolutivo, contudo, mais espécies devem ser analisadas.

Com relação à família Pentatomidae, os complementos cromossômicos são mais conservados, sendo o mais frequente o de 14 cromossomos (85%) (REBAGLIATI et al., 2005). A exceção desta família é *Dichelops melacanthus* que apresentou 2n= 12 (10A+XY). Souza et al. (2011) estudaram o complemento cromossômico dessa espécie e sugeriram que houve uma fusão recente de dois autossomos, formando um cromossomo maior. Tal hipótese é corroborada por trabalho, uma vez que *D. melacanthus* apresentou tal característica como autapomorfia.

Com relação às famílias do grupo externo no cenário evolutivo da família Pentatomidae, Ueshima (1979) descreve Cydninae (Cydnidae) como apresentando complemento cromossômico 2n= 14 (12A+XY). Este complemento cromossômico também pode ser verificado para a família Pentatomidae, exceto para a espécie *Dichelops melacanthus*. Jacobs (1989) encontrou também um número cromossômico de 2n= 20 (16A+2m+XY), para algumas espécies. Ainda, a espécie *Thaumastella namaquensis* (Thaumastellidae) apresentou 2n= 17 (12A+2m+X_1X_2Y) e 2n= 18 (14A+2m+XY) e *T. elizabethae* 2n= 20 (16A+2m+XY), sendo, até o momento, característica dessa família a presença de m-cromossomos. Henry (1997) sugeriu que os

m-cromossomos são uma sinapomorfia que define um amplo grupo dentro de Pentatomormorpha, ainda que perdido em poucos táxons (Berytidae, Lygaeinae e Piesmatidae). Jacobs (1989) sugere que devido à presença de m-cromossomos em Thaumastellidae, essa família pode não pertencer a Pentatomoidae. A presença de m-cromossomos pode ainda relacionar Thaumastellidae a Coreidae. Neste contexto, pode-se sugerir que em Coreidae houve perda do cromossomo sexual Y, já que o mecanismo de determinação do sexo nessa família é X0.

Com esse trabalho foi possível verificar a complexidade das distribuições das características testiculares e citogenéticas entre os Heteroptera, em especial, das famílias Coreidae e Pentatomidae, sendo necessário aprofundar os estudos evolutivos das espécies dessas famílias com novas abordagens para elucidar a evolução desses caracteres. Pode-se ainda tornar as inferências evolutivas mais consistentes, confiáveis e robustas. Para isso pode-se utilizar outros marcadores, como por exemplo, os genes do complexo I NADH desidrogenase, em especial o gene ND5, que na análise de neighbor-joining, utilizando espécies da ordem Hemiptera obteve-se uma média de bootstrap de 73,37% e menor formação de agrupamentos parafiléticos quando comparado com outros genes.

IX. CONCLUSÕES

Os aspectos peculiares que vem sido descritos para Heteroptera que foram caracterizados no presente estudo, fascinam pela diversidade e complexidade em determinar seu cenário evolutivo. Dessa maneira, esta tese caracterizou e avaliou o potencial discriminativo da variabilidade genética nas espécies de Heteroptera, a partir das análises das sequências geradas dos genes mitocondriais citocromo oxidase subunidade I (COI) e o ribossomal 16S e o gene nuclear ribossomal 18S. Com essas análises, foram fornecidos subsídios para as interpretações filogenéticas do grupo com relação às diversas características apresentadas. Assim verificamos que:

1. Sozinhos, genes COI, 16S e 18S não conseguem fornecer uma inferência segura para as análises evolutivas. Esses genes devem ser utilizados em conjunto com outros genes, para exploração evolutiva nas famílias de Heteroptera estudadas;
2. Com estes três genes concatenados, as informações podem-se somar;
3. A pigmentação da bainha peritoneal apresenta um cenário heterogêneo, sendo a pigmentação avermelhada representada nas espécies derivadas, como nas tribos Leptoscelini e Anisoscelidini (Coreidae) e na tribo Carpocorini (Pentatomidae);
4. As espécies da família Coreidae apresentaram um cenário evolutivo controverso quanto ao número de lobos testiculares, enquanto que para a família Pentatomidae houve redução do número de lobos;
5. A presença das espécies possuidoras do lobo *harlequin* e com células polimégalas ocorre nas espécies que se divergiram primeiro, sendo, portanto, que em algumas espécies houve a redução do número de lobos, como as espécies do gênero *Oebalus*, ou houve formação de espermatozoides não fertilizantes, como em *Antiteuchus tripterus* ou *Chlorocoris complanatus*;
6. Fusões e fissões cromossômicas podem ocorrer, sem que haja um padrão evolutivo definido, sendo que para a espécie *Dichelops melacanthus* (Pentatomidae) houve fusão cromossômica;
7. É necessária a exploração desse complexo cenário evolutivo que envolve essas características com novas abordagens, como a utilização de caracteres morfológicos ou outros marcadores moleculares, como os genes do complexo NADH desidrogenase, em especial o gene ND5.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M. C., INFANTE-MALCHIAS, M. E. **RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA** – In: MATIOLI, S. R. (Ed.) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, p. 143-152, 2001.

BATZOGLOU, S.; PACHTER, L.; MESIROV, J. P.; BERGER, B.; LANDER, E. S. Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction: **Genome Research**, v. 10, p. 950-958, 2000.

BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T.; FAHEY, G. T.; FONTENILLE, D.; BRAACK, L. E. O.; HAWLEY, W. A.; COLLINS, F. H. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. **Genetics**, v. 147, p. 1817–1828, 1997.

BLANCHETTE, M.; SCHIKOWSKI, B.; TOMPA, M. Algorithms for phylogenetic footprinting. **Journal of computational Biology**, v. 9, n. 2, p. 211-223, 2002.

BOORE, J. L.; COLLINS, T. M.; STANTON, D.; DAEHLER, L. L.; BROWN, W. M. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature**, v. 376, n. 6536, p.163-165, 1995.

BRESSA, M. J.; PAPESCHI, A. G., MOLA, L.; LARRAMENDY, M. L. Autossomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* and *Jadera sanguinolenta* (Heteroptera: Rhopalidae: Serinethinae). **European Journal of Entomology**, v. 98, p. 151-157, 2001.

BUCK, R. C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus:* the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

CAMPBELL, B. C.; STEVEN-CAMPBELL, J. D.; SORENSEN, J. T.; GILL, R. J. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequence. **Syst. Entomol.**, v. 20, p. 175–194, 1995.

CASTANHOLE, M. M. U., PEREIRA, L. L. V. , SOUZA, H. V., BICUDO, H. E. M. C., COSTA, L. A. A. , ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

CATTANI, M. V.; PAPESHI, A. G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera). **Hereditas**, v. 140, p. 105-111, 2004.

CERETTI JUNIOR, W., VENDRAMI, D. P., GIL, J. M., BARATA, J. M. S.; MARRELLI, M. T. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de

Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 455-462, 2008.

CHICKERING, A. M.; BACORN, B. Spermatogenesis in the Belatomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus.* **Pap. Mich Acad Sci Arts Lelt**, v. 17, p. 529-534, 1933.

COLOMBO, P.; BIDAU, C. Estudios cromosómicos en heterópteros argentinos. I. Los cromosomas meióticos de cinco espécies de Coreidae. **Physis Secc. C.**, v. 43, 29-40, 1985.

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.

CORNELI, O. S.; WARD, R. H. Mitochondrial genes and mammalian phylogenies: increasing the reliability of branch length estimation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 224-234, 2000.

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

DEY, S. K.; WANGDI, T. Chromosome number and sex chromosome system in forty-four species de Heteroptera. **Chromosome Inf. Serv.**, v. 45, p. 5-8, 1988.

DOTSON E.M.; BEARD C.B. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Mol. Biol.**, v. 10, p. 205–215, 2001.

FRAZER, K. A.; ELNITSKI, L.; CHURCH, D. M.; DUBCHAK, I.; HARDISON, R. C. Cross-species sequence comparisons: A review of methods and available resources. **Genome Research**, v. 13, p. 1-12, 2003.

GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S.; HAN, H. Y.; MCPERON, B. A.; STECK, G. J. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. **Insect Molecular Biology**, v. 4, p. 61-67, 1995.

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.

GROSSMAN, L. I.; LOMAX, M. I. Nuclear genes for cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophisica Acta**, v. 1352, p. 174-192, 1997.

GROZEVA, S. M. The occurrence of m-chromosomes in the karyotypes of six species of the Oxycareninae (Heteroptera, Lygaeidae). **Folia Biologica** (Kraków), v. 43, n. 1-2, p. 55-59, 1995.

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

HUELSENBECK, J. P.; BULL, J. J.; CUNNINGHAM, C. W. Combining data in phylogenetic analysis. **Trends Ecol. Evol.**, v. 11, p. 152-158, 1996.

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

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

JANDE, S. S. An analysis of the chromosomes in four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocerata). **Res Bull (NS) Panjab Univ**, v. 10, p. 25-34, 1959.

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

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

KJER, K. M. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 4, p. 314–330, 1995.

KOONIN, E. V.; MUSHEGIAN, A. R.; BORR, P. Non-orthologous gene displacement. **Trends in Genetics**, v. 12, p. 334-336, 1996.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. **PNAS**, v. 105, n. 8, 2761-2762, 2008.

LANZONE, C., EBENEZER, B.; SOUZA, M. J., Comportamiento meiotico en tres especies de la familia Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). **J. Bas. Appl. Genet. (formerly Mendeliana)**, v. 15, n. 2, p. 100, 2003.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; BESANSKY, N. J.; ESCALANTE, A. A.; COLLINS, F. H.; HAWLEY The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya: The mtDNA perspective. **Journal of Heredity**, v. 91, p. 165-168, 2000.

LENHARD, B.; SANDELIN, A.; MENDOZA, L.; ENGSTROM, P. Identification for conserved regulatory elements by comparative genome analysis. **Journal of Biology**, v. 2, p. 13-30, 2003.

LI, H. M.; DENG, R. Q.; WANG, J. W.; CHEN, Z. Y.; JIA, F. L.; WANG, X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and**

Evolution, v. 37, p. 313-326, 2005.

LUDWIG, M. Z. Functional evolution of noncoding DNA. **Current opinion in Genetics & Development**, v. 12, p. 634-639, 2002.

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

MARDULYN, P.; WHITFIELD, J. B. Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Micrograstrinae (Hymenoptera; Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 12, p. 282–294, 1999.

MATIOLI, R. S., PASSOS-BUENO, M. R. S. **Métodos baseados em PCR para análise de plimorfismos de ácidos nucléicos**. In: MATIOLI, S. R. (ED.). Biologia Molecular e Evolução, Ribeirão Preto, Holos, p. 153-161, 2001.

MEMON, N.; MEIR, R.; MANAN, A.; FENG-YI SU, K. On the use of DNA sequence for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bugs genus *Halys* (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. **Systematic Entomology**, v. 31, p. 703-710, 2006.

MITCHELL, P. L. Heteroptera as vectors of plant pathogens. **Neotrop. Entomol.** v. 33, n. 5, p. 519-545, 2004.

MITCHELL, P. L. Leaf-footed bugs (Coreidae), p. 337-403. *In*: C. W. SCHAEFER & A. R. PANIZZI (eds.). **Heteroptera of Economic Importance**. Boca Raton, CRC Press, 828 p. 2000.

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

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

NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWTON, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Med Vet Entomol**, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2007.

NOBREGA, M. A.; PENNACCHIO, L. A. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. **Journal of Physioly**, v. 554, n. 1, p. 31-39, 2004.

NOKKALA, S. NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). **Hereditas**, v. 99, n. 1, p. 131-134, 1983.

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

OLSEN, G. J., WOESE, C. R. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.**, v. 7, p. 113-123, 1993.

PANIZZI, A. R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 29, p. 1-12, 2000.

PAULMIER, F. C. The spermatogenesis of *Anasa tristis*. **J. Morphol.** , v. 15 suppl., 1899.

PFEILER, E.; BITLER, B. G.; RAMSEY, J. M.; PALACIOS-CARDIEL, C.; MARKOW, T. A. Genetic variation, population structure , and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, p. 209-221, 2006.

PFENNINGER, M.; NOWAK, C.; KLEY, C.; STEINKE, D.; STREIT, B. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. **Mol. Ecol.**, v. 16, n.9, p.1957-1968, 2007.

PRIMROSE, S. B.; TWYMAN, S. R. **Principles of Genome analysis and genomics**, 3 ed. Turin: Blackwell Publishing Company, 263p., 2003.

RATASINGHAM, S.; HEBERT P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System http://www.barcodinglife.org. **Mol Ecol Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

REBAGLIATI P. J.; MOLA, L. M.; PAPESCHI, A. G. Karyotype and meiotic behaviour of the holokinetic chromosomes of six Argentine species of Pentatomidae (Heteroptera). **Caryologia**, v. 54, p. 339-347, 2001.

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

RICHTER, O. H. M.; LUDWIG, B. Cytochrome c oxidase- structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. **Review of Physiology, Biochemestry & Pharmacology**, v. 147, p. 47-74, 2003.

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

SAINZ, A. C.; MAURO, L. V.; MORIYAMA, E. N.; GARCÍA, B. A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genetica**, v. 121, n. 3, p. 229-40, 2004.

SANDS, V. E. Cytological studies of the Coreidae and Alydidae (Hemiptera: Heteroptera). II. Karyological changes exemplified by Malaysian Genera. **Caryologia**,

v. 35, n. 3, p. 335-345, 1982.

SATAPATHY, S. N.; PATNAIK, S. C. Chromosome numbers in fourty-one species of Indian Heteroptera. **Chromosome Inf. Serv.**, v. 47, p. 3-5, 1989.

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

SCHRADER, F. Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). **Biological Bulletin**, n. 88, p. 63-70, 1945a.

SCHRADER, F. The cytology of regular heteroploidy in the genus *Loxa* (Pentatomidae ± Hemiptera). **Journal of Morphology**, n. 76, p. 157-177, 1945b.

SCHRADER, F. The elimination of chromosomes in the metiotic divisions of *Brachystethus rubromaculatus* Dallas. **Biol. Bull.**, v. 90, p. 19-31, 1946a.

SCHRADER, F. Autossomal elimination and preferential segregation in the *harlequin* lobe of certain Discocephalini (Hemiptera). **Biol. Bull.**, v. 90, p. 264-290, 1946b.

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

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

SCHWARTS, S.; ZHANG, Z.; FRAZER, K. A.; SMIT, A.; RIEMER, C.; BOUCK, J.; GIBBS, R.; HARDISON, R.; MILLER, W. PipMaker – A web server for Aligning two genomic DNA sequences. **Genome Research**, v. 10, p. 577-586, 2000.

SHOUBRIDGE, E. A. Cytochrome c oxidase deficiency. **American Journal of Medical Genetics**, v. 106, p. 46-52, 2001.

SIMON C.; FRATI F.; BECKENBACH A.; CRESPI B.; LIU H.; FLOOK P.; Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n.6, p. 651-701, 1994.

SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Eletronica y Biologia Celular**, v. 11, p. 179-195, 1987.

SORENSEN, J. T.; CAMPBELL, B. C.; GILL, R. J.; STEVEN-CAMPBELL, J. D. Non-monophyly of Aucnehorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: Eco-evolutionary and cladistic implications within pre-Heteropterodea Hemiptera (s. l.) and a proposal for new monophyletic suborders. **Pan-Pac. Entomol.**, v. 73, p. 31–60, 1995.

SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L. N.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007a.

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

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera:Lygaeidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 33-40, 2007b.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 686-691, 2008a.

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

SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Comparative Study of Spermatogenesis and Nucleolar Behavior in Testicular Lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

SOUZA, H. V.; MURAKAMI, A. S.; MOURA, J; ALMEIDA, E. C.; MARQUES, I. F. G.; ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, p. 333-345, 2011.

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

STAHLS, G.; SAVOLAINEN, E. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 46, n. 1, p. 82-87, 2008.

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

UESHIMA, N.; ASHLOCK P. D. Cytotaxonomy of the Lygaeidae (Heteroptera). **Univ. Kans. Sci. Bull.**, v 51, p. 717-801, 1980.

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

WILMOTTE, A. **Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria**. In The Molecular Biology of Cyanobacteria, 1–25 pp. Edited by D. Bryant. Dordrecht, Netherlands: Kluwer, 1994.

WILSON E. B. Studies of chromosomes II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotropic chromosomes in Hemiptera. **J. Exp. Zool.** v. 2, p. 507–545, 1905.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 221–271, 1987.

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

XIA, X., Z. XIE, K. KJER. 18S rRNA and Tetrapod Phylogeny. **Systematic Biology**, v. 52, n. 3, p. 283-295, 2003.

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

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

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, _____/_____/____

_____

Assinatura