

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 08/03/2021



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

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha
(Heteroptera)

São José do Rio Preto
2019

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha
(Heteroptera)

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

Financiadora: CNPq – Proc. 140726/2015-2

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mary Massumi
Itoyama

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti
Cabral de Mello

São José do Rio Preto
2019

F525i

Firmino, Tatiani Seni de Souza

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

75 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Mary Massumi Itoyama

Coorientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Tatiani Seni de Souza Firmino

Inferências Evolutivas e Citotaxonômicas em Pentatomomorpha
(Heteroptera)

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

Financiadora: CNPq – Proc. 140726/2015-2

Comissão Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

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

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

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

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

São José do Rio Preto
08 de março de 2019

Dedicatória

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A todos, Muito Obrigada!

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

Resumo

Resumo

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

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

Abstract

ABSTRACT

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

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

Sumário

SUMÁRIO

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

Introdução

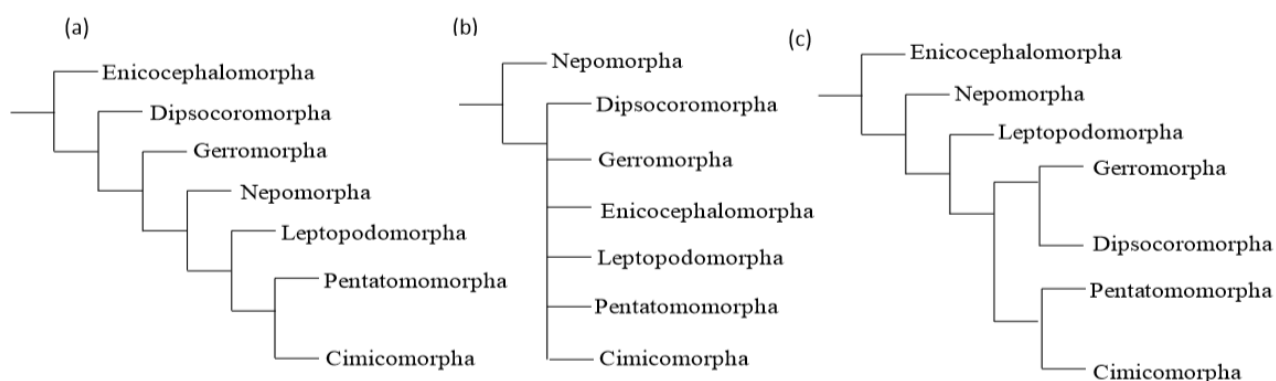
1 INTRODUÇÃO

1.1. Heteroptera: características gerais

A Subordem Heteroptera pertence ao Filo Arthropoda, a Classe Insecta e a Ordem Hemíptera. É constituída por sete infraordens (Leptopodomorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Pentatomomorpha, Cimicomorpha, Dipsocoromorpha e Enicocephalomorpha), com aproximadamente 80 famílias e mais de 40.000 espécies descritas. Possui habitat bem diversificado, a maioria das famílias ocorre em todos continentes (exceto na Antártica) e em muitas ilhas. Havendo espécies aquáticas, terrestres e micro predadores de pássaros e morcegos (SCHUH; SLATER, 1995).

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

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



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

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

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

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

1.2. Heteroptera: Características Citogenéticas

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

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

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

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

Em relação ao sistema cromossômico do sexo, as superfamílias mais primitivas Nepoidea e Gelastocoroidea apresentam sistema simples e múltiplo, com a presença do cromossomo Y (XY e X_nY). Já as superfamílias mais recentes Naucoroidea e Notonectoidea apresentam um par de m-cromossomos e diferentes sistemas cromossômicos do sexo (X_0/XX e $X_1X_2/0/X_1X_1X_2X_2$), sem o cromossomo Y. Os dados citogenéticos disponíveis sugerem que a ausência de m-cromossomos e a presença de cromossomos sexuais X e Y poderiam ser considerados caracteres plesiomórficos. Os sistemas cromossômicos do sexo X_0 e $X_1X_2/0$ devem ter originado durante a evolução, por meio da perda do cromossomo Y e posterior fragmentação do cromossomo X; esses sistemas juntamente com a presença de um par de m-cromossomos poderiam ser considerados como caracteres derivados. Os m-cromossomos são um par cromossomos minúsculo, presentes em algumas famílias de Heteroptera. Eles possuem um comportamento meiótico especial, sendo geralmente observados não pareados durante a prófase meiótica e nenhum quiasma é detectado entre eles. É incerto qual é a origem desse par de cromossomos e qual é a sua função no sistema genético das espécies que os possuem (UESHIMA, 1979). Havendo assim a necessidade de estudos, que auxiliem na elucidação de sua origem e função.

1.3. Infraordem Pentatomomorpha

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

A família Coreidae é composta por aproximadamente 1800 espécies, distribuídas em 257 gêneros. Apresentam porte avantajado, cores brilhantes, e a maioria das espécies possui dilatação foliácea nas tíbias do par de pernas posteriores (SCHUH; SLATER, 1995), ficando conhecidos popularmente como insetos de folhas nos pés (HENRY, 2009). São cosmopolitas, contudo mais concentradas em regiões tropicais. Aproximadamente 82 espécies têm sido mencionadas, na literatura, como potencialmente prejudiciais às plantações. Dentre as culturas que podem atacar estão as de arroz, tomate, leguminosas, mandioca, abóbora, castanheiras e muitas frutas como: maracujá, acerola e goiaba (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Algumas espécies dessa família têm sido descritas como vetores de doenças a algumas plantas, podendo transmitir, por meio da penetração dos estiletes, alguns microorganismos, como fungos e bactérias e também alguns vírus (BOHER et al., 1983). Em relação às características filogenéticas, Li (1996) classifica o grupo como monofilético.

Já a família Pentatomidae possui aproximadamente, 4.500 espécies distribuídas em 760 gêneros (GRAZIA et al., 2008), estando representada nas principais regiões faunísticas do globo terrestre (GRAZIA; SCHWERTNER, 2011). São economicamente importantes, devido ao status de pragas agrícolas ou agentes de controle biológico (PANIZZI et al., 2000). Esses insetos tem um papel importante nas florestas, atuando como indicadores ambientais, visto que respondem aumentando ou diminuindo sua diversidade, de acordo com o impacto causado por mudanças ambientais na diversidade taxonômica e

química da vegetação (BROWN, 1997). De acordo com Schuh e Slater (1995) os limites taxonômicos de Pentatomidae eram bastante controversos e pouco definidos. Todavia, essa família foi reconhecida como grupo monofilético por Grazia et al. (2008) com base em caracteres morfológicos e moleculares.

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

1.4. Infraordem Cimicomorpha

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

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

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

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

1.5. Infraordem Nepomorpha

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

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

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

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

1.6. O DNA ribossômico 45S

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

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

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

1.7. A Sonda 18S e a Técnica de FISH

O gene nuclear 18S, possui, cerca de 1.800 a 2.000 pb, apresentando-se muito conservado e, portanto, apropriado para resoluções de filogenias. Esse gene possui informações que permitem avaliar relações entre organismos com tempos de divergência maiores que 100 milhões de anos. Contudo, esse marcador molecular pode também ser utilizado em análises de espécies distantes no interior do mesmo gênero, pois se mostrou adequado para inferir relações filogenéticas entre gêneros e tribos de triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae) (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

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

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

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

Conclusões

5 CONCLUSÕES FINAIS

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

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

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

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

Referências

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. E.; FOLLY-RAMOS, E.; PETERSON, A. T.; LIMA-NEIVA, V.; GUMIEL, M.; DUARTE, R.; LIMA, M. M.; LOCKS, M.; BELTRÃO, M.; COSTA, J. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, p. 410–417, 2009.
- AVELAR, R. C.; QUINTILIANO, A. A.; FARIA, G.; DOURADO, D. C.; FRAGA, A. C.; CASTRO NETO, P. Avaliação da ocorrência do percevejo *Pachycoris torridus* em plantas de pinhão-mansão do banco de germoplasma da UFLA. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2007.
- BARBOSA, N. C. C. P.; FREITAS, S.; MORALES, A. C. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and *COI* gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, 2014.
- BARDELLA, V. B.; FERNANDES, J. A. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, p. 1919-1925, 2016.
- BOHER, B.; DANIEL, J. F.; FABRES G.; BANI, G. Action de *Pseudotheraptus devastans* (Distant)(Het. Coreidae) et de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. dans le développement de chancres et la chute des feuilles chez le manioc (*Manihot esculenta* Crantz)(1). **Agronomie**, v. 3, n. 10, p. 989-994, 1983.
- BROWN, K. S. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. **Journal of Insect Conservation**, v. 1, n. 1, p. 25-42, 1997.
- BUCK, R. C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. **Journal Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 10, p. 393-400, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chromosome Research, v. 4, p. 124-132, 1996.

GRAZIA J.; SCHUH, R. T.; WHEELER, W. C. Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). **Cladistics** v. 24, n. 6, p. 932-976, 2008.

GRAZIA, J.; SCHWERTNER, C. F. Checklist dos percevejos-do-mato (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomoidea) do Estado de São Paulo, Brasil.

Biota Neotropica, vol. 11, 2011.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os Insetos: Um resumo de Entomologia**.

Department of Entomology, University of California, Davis, USA, 2008.

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

HUGHES-SHCRADER, S.; SHCRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera.

Chromosoma, v. 12, p. 327-350, 1961.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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