

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

GUSTAVO HENRIQUE SILVA SANTOS

Análise filogenética do gênero *Euschistus* Dallas, 1851 utilizando o gene
Citocromo oxidase subunidade I

Porto Alegre

Julho, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

GUSTAVO HENRIQUE SILVA SANTOS

Análise filogenética do gênero *Euschistus* Dallas, 1851 utilizando o gene
Citocromo oxidase subunidade I

Trabalho apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel no curso de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Luiz Alexandre Campos

Co-orientador: Dr. Filipe Michels Bianchi

Porto Alegre

Julho, 2017

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma participaram durante minha jornada de graduação. Gostaria de agradecer principalmente à minha família que sempre serviu como base e apoio durante minha vida e não poderia ser diferente nessa etapa. À minha mãe Lourdes, gostaria de agradecer por estar sempre ao meu lado durante minhas escolhas e pelo afeto incondicional que sempre teve por mim, ao meu avô Wenceslau pelo suporte e confiança que sem os quais eu sei que não estaria aqui. Ao meu irmão, madrinha, tios e primos que acrescentaram em minha vida, mesmo que talvez não saibam o impacto que tiveram sobre mim.

Gostaria também de agradecer ao professor Doutor Luiz Alexandre que aceitou a missão de me orientar nesse trabalho e ao Doutor Filipe Michels pelas idéias, incentivos, cobranças e todo suporte que foram essenciais para a realização desse trabalho. Aos amigos que fiz durante a graduação, e que infelizmente perdemos contato com o passar do tempo: Aline, Davi, Gabriel, Pedro, Natashe e Thaís. Aos amigos de infância que são muito importantes e também participaram e ajudaram durante esse trajeto.

Por fim, gostaria de agradecer à minha amiga, companheira, parceira e namorada Nicolle, que acompanhou os momentos difíceis ao meu lado e nunca permitiu que eu desistisse. Agradeço a ela também pelo amor, carinho e compreensão que foram essenciais para que eu pudesse vencer alguns obstáculos que apareceram no caminho. Sua mãe Raquel e os dois piás da casa, Laurinho e Gabriel, também ajudaram muito no desenvolvimento desse trabalho. Por último gostaria de agradecer pelos pequenos felinos que a vida me trouxe e que me mostraram um amor que não conhecia e por toda paz e tranquilidade que me passam: Lancer, Capes, Zed, Fay e Sky.

Resumo

O gênero *Euschistus* é um dos maiores gêneros da tribo Carpocorini e necessita mais análises filogenéticas para melhor definir suas relações internas. Em especial, o subgênero nominal que não teve nenhuma abordagem evolutiva utilizando dados moleculares e é considerado um “depósito taxonômico” de espécies que não compartilhavam caracteres para serem alocados em outro subgênero. Escolhemos o gene citocromo oxidase subunidade 1 (COI) para realizar uma análise filogenética utilizando as informações contidas em bancos de dados *online* (BOLD e *GenBank*). Ao todo foram encontradas sequências de apenas 8 das 53 espécies do grupo, e uma árvore filogenética de maior verossimilhança foi construída junto com uma análise de distâncias entre elas e entre espécies de gêneros próximos. Os resultados apontam *Euschistus* como sendo parafilético e sugere uma hipótese para as relações interespecíficas do grupo.

Palavras-chave: COI, *Euschistus*, BOLD, Carpocorini, Filogenia

Abstract

The *Euschistus* genus is one of the largest groups inside the Carpocorini tribe and still lacks phylogenetics approaches to better define the internal relations inside the genus. In particular the nominal subgenus that had no evolutionary approach using molecular data and is considered a "taxonomic dumpster" of species that did not share characters to be allocated in another subgenus. We chose the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene to perform a phylogenetic analysis using the information contained in *online* databases (BOLD and GenBank). In all, sequences of only 8 of the 53 species of the group were found, and a phylogenetic tree of maximum likelihood was constructed along with an analysis of the genetic distances between them and between species of close genera. The results point to *Euschistus* as being paraphyletic and suggests a hypothesis for the interspecific relations of the group.

Keywords: COI, *Euschistus*, BOLD, Carpocorini, Phylogenetics

Sumário

1. Introdução.....	7
1.1. Barcode e Barcode of Life Data System (BOLD)	7
1.2. Subordem Heteroptera	8
1.3. Família Pentatomidae	9
1.4. Tribo Carpocorine e Gênero Euschistus Dallas, 1851	10
2. Objetivo geral	10
2.1. Objetivos específicos	11
3. Metodologia	11
4. Resultados	12
4.1. Sequências	12
4.2. Árvore Filogenética	12
4.3. Distância	13
5. Discussão.....	13
6. Conclusão.....	15
7. Referências Bibliográficas	15
ANEXO A – Tabela de indivíduos (<i>Acession Number</i> , <i>Localidade</i>)	21
ANEXO B – Árvore Filogenética de maior verossimilhança (ln-2627.7594)	22
ANEXO C – Tabela de distâncias par a par	23

1. Introdução

Nas últimas décadas, novas tecnologias têm sido agregadas a estudos taxonômicos e sistemáticos com o intuito de melhorar a obtenção de dados úteis para o diagnóstico de espécies e hipóteses de relacionamento entre os taxa, em particular as análises filogenéticas de DNA e sequências proteicas que se tornaram grandes ferramentas para estudar evolução molecular (Nei & Kumar, 2000; Giribet, 2015; Karp *et al.*, 1997; Goloboff *et al.*, 2008). Entre as técnicas e tecnologias se encontram as bases de dados *online*, programas de computadores que analisam foto micrografias e imagens e outros programas realizam análises complexas e projeções aproximadas, além da gama de possibilidades que o advento do sequenciamento de DNA tem proporcionado (Nei & Kumar, 2000; Goldstein, 2011). Particularmente, um pequeno fragmento de 648 pares de bases do gene mitocondrial, citocromo oxidase subunidade I (COI) foi proposto como o primeiro código de barras (BARCODE) de membros do reino animal (Hebert *et al.* 2003a; Savolainen *et al.* 2005), com diversos estudos comprovando a utilidade do DNA Barcode para identificar e distinguir espécies animais (Hebert *et al.* 2004; Ward *et al.* 2005).

1.1. *Barcode e Barcode of Life Data System (BOLD)*

Em 2003, Hebert e colaboradores iniciam a utilização de marcadores moleculares para criar um “código de barras” (Barcode) para identificar as espécies. Acreditava-se que com isso se removeria um pesado fardo dos taxonomistas, que utilizavam-se principalmente de caracteres morfológicos para a identificação de espécies (Goldstein, 2011). O que gerava problemas quando se tratava, por exemplo, de espécies crípticas, onde a morfologia não bastava para diferenciar espécies muito semelhantes (Brower, 1996). Assim, a iniciativa Barcode pretendia padronizar um fragmento de gene, a subunidade 1 da citocromo oxidase (COI), de tamanho de 648 pares de base como um identificador provisório para espécies e amostras (Goldstein, 2011). O objetivo era obter uma sequência de DNA de diversos indivíduos, do maior número de populações do maior número possível de espécies (Savolainen *et al.*, 2005).

O *Barcode of Life Data System (BOLD)* é um banco de dados com o intuito de auxiliar a aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros de DNA barcode (Ratnasingham & Hebert, 2007). É uma ferramenta gratuita que integra informações moleculares, morfológicas e geográficas que ficam disponíveis a qualquer pesquisador interessado em utilizar o DNA barcode em seus estudos (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Segundo Park (2011), o DNA barcode é uma boa ferramenta para identificação e análises dentro do grupo Heteroptera, e reitera a necessidade de expandir a quantidade de sequências nesse banco de dados para aumentar ainda mais sua precisão e eficiência.

Em 2004 criou-se o Consortium for the Barcode of Life (CBOL), que conta com diversas organizações de vários países, e tinha o objetivo de em 20 anos criar uma biblioteca de DNA Barcode para todos os animais eucarióticos (Ratnasingham & Hebert, 2007). Então, o CBOL sabendo da massiva quantidade de dados que essa iniciativa iria gerar, entrou em acordo com grandes bancos genômicos, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI), organizações de biodiversidade como a Global Biodiversity Information Facility (GBIF) entre outros para definir parâmetros e requisitos para receber a denominação de Barcode. Kvist (2013) realizou um estudo para analisar a qualidade e quantidade de sequências conjuntas nos bancos GenBank e BOLD, onde encontrou informação de 15% da biodiversidade total reconhecida, com mais de 230 mil táxons únicos citados, mostrando o grande potencial e a importância desses bancos de dados *online* para o avanço do DNA barcode.

Apesar disso, o DNA Barcode já foi criticado, temido e não aceito ou não entendido (DeSalle *et al.*, 2005; Will *et al.*, 2005; Ebach, 2011). Mas não impediu de ser cada vez mais utilizado pelos pesquisadores e se tornar uma importante ferramenta como parte de uma taxonomia integrativa na descrição de novas espécies (Stoev *et al.*, 2010; Wesener *et al.*, 2011; Hendrich & Balke, 2011; Butcher *et al.*, 2012) além de auxiliar em outras áreas da biologia como biologia de pragas (Engstram *et al.*, 2010), biologia da conservação (Neigel *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008) e ciência forense (Meiklejohn *et al.*, 2011).

1.2. Subordem Heteroptera

A subordem Heteroptera compreende mais de 40 mil espécies descritas, dentre eles os percevejos verdadeiros, sendo uma das mais bem sucedidas irradiações em relação ao número de espécies e hábitos de vida dentre insetos hemimetábolos (Weirauch & Schuh, 2011). Estão presentes nas principais regiões biogeográficas e possuem capacidade de perfurar tecidos vegetais, por este motivo, muitas espécies são consideradas pragas agrícolas (Panizzi, 1997; Corrêa-Ferreira & de Azevedo, 2002; Hosokawa *et al.*, 2007). Algumas espécies são de interesse sanitário, como o barbeiro *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae), vetor da doença de Chagas que recentemente teve o seu genoma sequenciado, revelando adaptações únicas à hematofagia e parasitismo (Mesquita *et al.*, 2015). Outras despertam interesse pelo potencial econômico, como no caso da espécie *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Miridae) que

contribui para o controle de ovos e larvas de pragas de arroz, como o gafanhoto marrom *Nilaparvata lugens* Stahl e outros insetos, no continente asiático (Katti *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2014; Sigsgaard, 2007). Esses estudos demonstram o grande potencial que o grupo tem, e quão importante é a necessidade de estudos dos mais diversos aspectos, como biologia, comportamento, ecologia entre outros.

A primeira análise cladística da subordem Heteroptera foi realizada por Schuh (1986) e utiliza para o desenvolvimento de sua hipótese unicamente dados morfológicos, com enfoque no aparato genital masculino e feminino, tanto estruturas internas como externas. Desde então, estudos filogenéticos em diferentes níveis taxonômicos têm sido desenvolvidos com a inclusão de dados moleculares (p. ex. Wheeler *et al.*, 1993; Grazia *et al.*, 2008; Schuh *et al.*, 2009). O desenvolvimento das técnicas e teorias para sistemática molecular aumentaram significativamente o embasamento para formulação de hipóteses sobre as relações dentro de Heteroptera (Weirauch & Schuh, 2011). Enquanto as análises moleculares são mais comumente usadas para aferir hipóteses a nível de família ou acima, quando se trata de gêneros ou tribos, as análises morfológicas ainda são quase que exclusivamente utilizadas, ainda que algumas filogenias combinando ambas tenham sido publicadas (Bianchi *et al.*, 2017).

De acordo com Weirauch e Schuh (2011) o uso de métodos cladísticos demonstrou ser um rigoroso teste para reprovar algumas hipóteses de monofilia como de Anthocoridae (Schuh, 1991), Lygaeidae (Henry, 1997) e Triatominae (Weirauch, 2008). A análise cladística pode também ser utilizada para avaliar e melhor posicionar novos táxons, como é o caso da família Curaliidae descrita em 2008 por Schuh e colaboradores, além de propor hipóteses testáveis para outros campos como história biogeográfica, cuidado parental e estratégias de captura de presas (Weirauch & Schuh, 2011). A monofilia de Heteroptera é bem documentada tanto por dados moleculares como por dados morfológicos, apesar de existirem algumas sinapomorfias contraditórias no grupo. Segundo Carver *et al.* (1991) e Wheeler *et al.* (1993) três caracteres diagnósticos do grupo são sinapomorfias: labium inserido anteriormente na cabeça; presença de glândulas odoríferas metatorácicas em adultos; e imaturos com glândulas odoríferas dorsais abdominais.

1.3. Família Pentatomidae

Dentro de Heteroptera, temos os pentatomídeos, também conhecidos como percevejos-de-planta ou percevejos-do-mato e reconhecidos pelo corpo de tamanho médio, usualmente variando de 2 a 20 mm, de forma oval a elíptica, antenas geralmente com cinco

segmentos e escutelo amplo, reproduzido de *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history* (Schuh & Slater, 1995). Apresentam coloração negra, castanha e tons escuros, compondo padrões crípticos com o ambiente onde vivem, podendo ser também de cores vivas como verde, vermelho, alaranjado e possuir detalhes brilhantes e traços aposemáticos (Grazia *et al.*, 1999). Pentatomidae é a maior família entre os pentatomóideos e a quarta maior em Heteroptera (Grazia *et al.*, 1999, Panizzi & Grazia, 2015). O grupo inclui mais de 4.700 espécies válidas, distribuídas em quase 900 gêneros e dez subfamílias (Grazia *et al.*, 2015; Panizzi & Grazia, 2015; Rider, 2016). As hipóteses sobre a monofilia de Pentatomidae não são completamente concordantes. Trabalhos com conjuntos de dados de naturezas diferentes como morfológicos (Gapud, 1991), moleculares (Wu *et al.*, 2016) ou combinados (Grazia *et al.*, 2008) apresentam diferentes relações entre grupos dentro da família. É importante continuar com os testes filogenéticos, com o intuito de achar novas hipóteses para elucidar essas relações internas dentro de Pentatomidae, em diversos níveis taxonômicos (Bianchi *et al.*, 2017; Grazia *et al.*, 2008).

1.4. Tribo Carpocorine e Gênero *Euschistus* Dallas, 1851

Em 1866 Mulsant & Rey propuseram a tribo Carpocorini, porém não existe um teste filogenético que sustente uma hipótese de monofilia. Possuindo mais de 100 gêneros e 450 espécies é a maior tribo dentre os pentatomóideos (*sensu* Rider 2016). Nessa tribo se encontra o gênero *Euschistus* Dallas, um dos maiores dentro de Pentatomidae com mais de 60 espécies, das quais nove tem distribuição originalmente neártica e o restante neotropical (Weiler *et al.*, 2016; Bianchi *et al.*, 2017). Conhecidos como percevejos-castanhos devido à sua coloração dorsal, é um gênero com poucos estudos sobre as relações do grupo, mas recentemente Weiler *et al.* (2016) realizaram uma análise filogenética do subgênero *Lycipta*, concluindo se tratar de um subgênero parafilético, e Bianchi *et al.* (2017) analisaram o subgênero *Mitripus*, resultando em uma mudança na sua relação dentro do gênero *Euschistus*. Porém, o subgênero nominal, que atualmente é o maior deles, não possui nenhuma abordagem de caráter filogenético, sendo essenciais trabalhos que suportassem hipóteses para o grupo.

2. Objetivo geral

Analisar as relações internas das linhagens dentro de *Euschistus* Dallas utilizando sequências depositadas em bancos de dados *online* do fragmento COI, gerando uma hipótese baseada em uma árvore de gene.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar a monofilia de *Euschistus* baseados em dados moleculares com abordagens filogenéticas probabilísticas.

Quantificar a distância genética presente entre as espécies, e eventualmente dentro de algumas espécies selecionadas.

Avaliar se a metodologia utilizada é adequada à análise proposta.

3. Metodologia

Para realizar o estudo foram utilizados os dados moleculares do gene COI presentes nos bancos de dados *online* GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e BOLD (www.boldsystems.org/). Para realizar a coleta de dados nas plataformas *online* foram utilizadas as palavras-chave: *Euschistus COI*, *Euschistus Cox1*. Foram usadas todas as espécies do gênero com dados disponíveis, e limitando ao máximo cinco indivíduos de cada espécie, pois uma maior quantidade de sequências da mesma espécie agregaria pouca informação relevante, diferente de um maior número de espécies com sequências que traria robustez aos dados. Como grupo externo foram adicionados na pesquisa gêneros considerados próximos a *Euschistus* de acordo com a literatura (para compilação dos gêneros do grupo *Euschistus* veja Bianchi 2016). Para enraizar a árvore filogenética foram utilizadas sequências de duas espécies de *Carpocoris* (para espécies utilizadas neste estudo veja Resultados). As escolhas das sequências foram feitas com base na quantidade e qualidade das sequências encontradas. Para padronização das amostras, o tamanho de 500 pares de base foi estipulado como tamanho mínimo para a sequência ser considerada válida e incluída no estudo.

As sequências encontradas foram baixadas, compiladas e checada a sua orientação no programa MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>). Os alinhamentos foram realizados também pelo *software* MEGA7, utilizando o algoritmo do *Muscle* com 8 iterações. Para aferir o melhor modelo evolutivo para a análise filogenética foi utilizado o programa Jmodeltest (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012), usando a ferramenta de critério de informação de Bayes (BIC). As análises de distância par a par foram realizadas utilizando os parâmetros com o modo *default* indicado, bem como análise de Máxima verossimilhança para a obtenção da hipótese filogenética com suporte de *bootstrap* de 1000 também foram realizadas no programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) seguindo as indicações de melhor modelo evolutivo resultantes da análise do Jmodeltest.

4. Resultados

4.1. Sequências

Foram encontradas um total de 189 sequências de indivíduos do gênero *Euschistus* no banco de dados BOLD e 132 entradas no GenBank. As sequências foram triadas quanto ao número de pares de base e confiabilidade da informação (Hebert *et al*, 2016; Gwiazdowski *et al*, 2015), procurando uma boa heterogeneidade das amostras, sempre buscando uma maior variedade de origem do indivíduo e número de pares de bases (Park *et al*, 2011; Greenstone *et al*, 2014; Tillman *et al*, 2015) , resultando na seguinte base de dados para o estudo: *E. conspersus* Uhler (2 indivíduos), *E. crassus* Dallas (2 indivíduos), *E. ictericus* (Linnaeus) (5 indivíduos), *E. obscurus* (Palisot de Beauvois) (5 indivíduos), *E. quadrator* Rolston (4 indivíduos), *E. servus* (Say) (5 indivíduos), *E. servus euschistoides* (Vollenhoven) (1 indivíduo), *E. servus servus* (Say) (1 indivíduo), *E. tristigmus* (Say) (5 indivíduos), *E. tristigmus luridus* (Say) (5 indivíduos) e *E. variolarius* (Palisot de Beauvois) (5 indivíduos). Como grupo externo, foram selecionadas amostras de um indivíduo de cada espécie de cinco gêneros próximos que dispunham de dados consistentes: *Coenus* (*C. delius*), *Dichelops* (*D. melacanthus*), *Dolycoris* (*D. baccarum*), *Hymenarcys* (*H. nervosa*) e *Proxys* (*P. punctulatus* e *P. albopunctulatus*) e para enraizar a análise filogenética *Carpocoris* (*C. purpureipennis* e *C. mediterraneus*), totalizando 48 sequências para as análises.

4.2. Árvore Filogenética

A seguinte árvore filogenética foi obtida utilizando máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo de tempo geral reversível (Nei & Kumar, 2008) com taxas gamma de sítios invariáveis (GTR+G+I) como sugerido pela análise feita no Jmodeltest, e tendo a árvore inicial gerada pelo algoritmo *neighbour-joining* (Tamura *et al*, 2004).

A árvore resultante com maior verossimilhança (ln-2627.7594) sugere a não monofilia do gênero *Euschistus* e expressa três clados principais, os quais agrupam espécies do gênero. O primeiro agrupando 8 táxons pertencentes à *Euschistus* (Clado A), um segundo clado com as espécies *E. crassus* e *E. obscurus* junto dos gêneros *Dichelops* e *Proxys* (Clado B), e o terceiro clado agrupando *E. quadrator* com *Coenus*, *Dolycoris* e *Hymenarcys* (Clado C).

No clado A foram agrupadas os táxons *E.servus*, *E. servus servus*, *E.servus euschistoides*, *E. variolarius*, *E. ictericus*, *E. conspersus*, *E. tristigmus* e *E. tristigmus luridus*. Os valores de suporte dos clados internos apresentam números consideráveis aceitáveis para suportar a relação dessas espécies de *Euschistus* (suporte de *bootstrap* >75). Entretanto as

subespécies de *Euschistus* não apresentaram valores de suporte de ramos tão consideráveis (suporte de *bootstrap* <75) para inferir a relação entre elas em relação ao nível de espécie propriamente dito.

O clado B demonstra uma relação maior de *E. crassus* e *E. obscurus* *Dichelops* e *Proxys* do que com o clado A. O clado C coloca a espécie *E. quadrator* mais relacionada aos gêneros *Coenus*, *Dolycoris* e *Hymenarcys* e estes como irmãos do clado (A+B).

4.3. Distância

A maior variação de distância genética encontrada entre espécies do gênero *Euschistus* foi entre as espécies *E. quadrator* e *E. ictericus*, chegando ao valor de 13%. Enquanto que a menor variação apresentada foi entre *E. variolarius* e *E. servus* (e suas subespécies), variando apenas 2%, e entre *E. servus* e *E. ictericus* que variou 3-4%. Para as subespécies de *E. servus*, foi encontrada uma variação entre 0% e 1%, e para a subespécie de *E. tristigmus*, o resultado obtido foi parecido, com exceção de um indivíduo (*Accession number*: KJ642016.1) que apresentou valores entre 3% e 4%. Os gêneros de grupo externo apresentaram uma variação de distância mínima de 9% e máxima de 12% em relação à espécies do gênero *Euschistus*. Porém entre *Dichelops* e *E. crassus*, e entre *Hymenarcys* e *E. servus* (e suas subespécies) a variação de distância foi de 8%.

5. Discussão

Este trabalho buscou explorar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Euschistus* utilizando dados moleculares do marcador *Citocromo oxidase subunidade I* presentes nos dois principais bancos de dados genéticos *online*. Secundariamente, avaliou-se as distâncias genéticas presentes entre indivíduos das subespécies descritas para *Euschistus tristigmus* e *Euschistus servus*. Os resultados da árvore filogenética e do teste de distância par a par indicam que há maior proximidade de algumas espécies de *Euschistus* com gêneros taxonomicamente relacionados do que com espécies dentro do gênero. *Euschistus crassus* está mais próxima de *Dichelops melacanthus* do que aparentemente está de *E. tristigmus*.

Segundo Memon *et al.* (2006) o DNA Barcode pode ser uma ferramenta muito útil para análises de limite de espécies que apenas morfologia não consegue diferenciar. Porém pode acontecer de os resultados de distância serem tão similares ao ponto de atrapalhar uma análise das mesmas. Nos resultados das subespécies, todas possuem variações baixas quando comparadas com outra subespécie ou a espécie propriamente dita, de modo similar ao que Memon *et al.* (2009) encontraram para espécies do gênero *Halys* Fabricius. *Euschistus servus*

e *E. servus euschistoides* possuem distância de 0% (0,001-0,007), o mesmo acontece para *E. tristigmus* e *E. tristigmus luridus*, e coloca em discussão se seriam subespécies ou apenas variantes morfológicas populacionais. Aqui deixamos em aberto sobre a delimitação das subespécies que utilizamos. Entendemos que maior quantidade de indivíduos é necessária e avaliação morfológica cuidadosa para tomar uma decisão taxonômica. Um outro aspecto preponderante para o uso de informações de banco de dados *online* é a confirmação da identificação das espécies. Cada vez menos se habilitam taxonomistas (Agnarsson & Kuntner, 2007), mesmo em meio à atual crise da biodiversidade (Korf, 2005). Isto acarreta em certa dúvida sobre a veracidade na identificação das espécies, mesmo quando o espécime faz parte de um trabalho científico publicado. Durante as buscas encontramos uma sequência identificada como *Euschistus tristigmus*, o registro fotográfico do voucher nos permite afirmar que se trata de um imaturo que não pertence à Pentatomidae (para acesso: http://www.barcodinglife.org/index.php/Public_RecordView?processid=ASAHE106-12). Deve-se tomar muito cuidado com o uso não criterioso de sequências presentes nestes bancos de dados públicos.

De acordo com a árvore filogenética, não há um suporte para a hipótese de monofilia do gênero *Euschistus*, mas sim de parafiletismo, onde *E. obscurus* e *E. crassus* estão separadas das outras espécies de *Euschistus* e mais relacionadas com gêneros próximos. Apesar dos suportes de *bootstrap* não apresentarem valores elevados, apontam para uma moderada possibilidade dessas relações. Isto evidencia a necessidade de se ampliar a quantidade de marcadores moleculares para o grupo. Outro aspecto a ser considerado é o número de espécies de *Euschistus* aqui amostrado. Nenhuma espécie do subgênero *Lycipta* foi contemplada neste estudo, evidenciando a carência de dados moleculares deste no banco de dados *online*. Nossa amostragem limitou-se a pouco mais de um sexto (8 de 53 espécies) do subgênero nominal. Precisa-se levar em conta também que o subgênero *Euschistus* pode ser considerado um “depósito taxonômico” dentro de Carpocorini, onde espécies historicamente foram alocadas por não possuírem os traços característicos de outros subgêneros, ou gêneros próximos (Cioato *et al.*, 2015). Então, é possível que espécies que estejam atualmente alocadas dentro de *Euschistus* venham a ser removidas e realocadas em outro subgênero de *Euschistus*, ou até mesmo integrem um novo gênero como já foi realizado (Bianchi *et al.*, 2017).

Atualmente trabalhos taxonômicos e filogenéticos têm sido realizados com espécies do gênero *Euschistus* ou grupos próximos (e.g. Cioato *et al.* 2015; Weiler *et al.*, 2016; Bianchi *et al.*, 2017). No entanto, poucos fazem uso desta ferramenta para explorar as delimitações de espécies, hipóteses de linhagens filogenéticas os diferentes usos atuais dos dados moleculares.

Aqui incentivamos fortemente que estudos futuros abordem suas problemáticas e subsidiem suas hipóteses utilizando dados moleculares, em especial o marcador COI quando o foco dos trabalhos permearem níveis taxonômicos próximos a espécie.

6. Conclusão

O gênero *Euschistus* e suas relações filogenéticas estão um pouco mais claras devido às recentes abordagens que autores realizaram (Weiler *et al.*, 2016; Bianchi *et al.*, 2017), porém é apenas o início por se tratar de um gênero numeroso e morfologicamente diverso. As análises que combinam morfologia com dados moleculares são muito importantes e vem sendo uma abordagem que traz maior robustez. Entretanto, mesmo estudos realizados utilizando apenas uma das metodologias podem auxiliar no melhor entendimento das relações do grupo, bem como levantar novas hipóteses e dar indícios de como abordar tais relações. Encontramos informações relevantes utilizando as sequências COI depositadas nos bancos de dados *online*, mas reiteramos que a quantidade de dados disponíveis ainda está muito defasada e carece de adições significativas, tanto para o número de espécies depositadas quanto número de sequências, o que não diminui o potencial da metodologia de DNA barcode para aferir tais relações filogenéticas. Mesmo assim, os resultados do presente estudo apontam o gênero *Euschistus* como parafilético com as relações dentro do subgênero nominal incertas e ainda bastante incompreendidas.

7. Referências Bibliográficas

- AGNARSSON, I., & KUNTNER, M. (2007). Taxonomy in a changing world: seeking solutions for a science in crisis. *Systematic Biology*, 56(3), 531-539.
- BIANCHI, F. M. (2016) Filogenia e sistemática de *Euschistus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) e gêneros relacionados: hipóteses baseadas em moléculas 2016. 152 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade do Rio Grande do Sul, 2016.
- BIANCHI, F. M. *et al.* (2017) Total evidence phylogenetic analysis and reclassification of *Euschistus* Dallas within Carpororini (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatominae). *Systematic Entomology*, v. 42, n. 2, p. 399-409, 2017.
- BROWER, A. V. (1996). A new mimetic species of *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae), from southeastern Colombia, revealed by cladistic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 116(3), 317-332;

- BUTCHER, B. Areekul *et al.* A turbo-taxonomic study of *Thai Aleiodes* (*Aleiodes*) and *Aleiodes* (*Arcaleiodes*)(Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae) based largely on COI barcoded specimens, with rapid descriptions of 179 new species. *Zootaxa*, v. 3457, n. 1, p. 1-232, 2012.
- CARVER M, Gross GF, Woodward TE. 1991. Hemiptera (bugs, leafhoppers, cicadas, aphids, scale insects, etc.). In *The Insects of Australia*, ed. ID Naumann, PB Carne, pp. 429–509. Melbourne, Victoria: Melbourne Univ. Publ.
- CIOATO, A. *et al.* (2015). New species of *Euschistus* (*Euschistus*) from Jamaica, *Euschistus* (*Mitripus*) and *Ladeaschistus* from southern South America (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae: Pentatominae). *Zootaxa*, v. 4048, n. 4, p. 565-574, 2015.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S., & De Azevedo, J. (2002). Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agricultural and Forest Entomology*, 4(2), 145-150;
- DARRIBA D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- DESALLE R, Egan MG, Siddall ME (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science* 360: 1905–1916.
- EBACH M.C. (2011) Taxonomy and the DNA barcoding enterprise. *Zootaxa* 2742: 67–68.
- ENGSTRAND, Rachel C. *et al.* (2010) Genetic variation in avocado stem weevils *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Mitochondrial Dna*, v. 21, n. sup1, p. 38-43, 2010.
- GAPUD, V.P. (1991) A generic revision of the subfamily Asopinae, with consideration of its phylogenetic position in the family Pentatomidae and superfamily Pentatomoidea (Hemiptera-Heteroptera). *Philippines Entomology*, 8, 865–961.
- GIRIBET, Gonzalo. New animal phylogeny: future challenges for animal phylogeny in the age of phylogenomics. *Org Divers Evol*, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- GOLDSTEIN, P. Z., & DeSalle, R. (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33(2), 135-147;
- GOLOBOFF, P., Farris, J., Nixon, K. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- GRAZIA, J., Fortes, N.D.F., Campos, L.A. (1999) Pentatomoidea. In: Brandão C, Canello E (eds) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*. FAPESP, São Paulo, pp 101–112

- GRAZIA, J., Panizzi, A.R., Greve, C., Schwertner, C.F., Campos, L.A., Garbelotto, T.A. & Fernandes J.A.M. (2015) Stink bugs (Pentatomidae). True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics (ed. by A.R. Panizzi & J. Grazia) pp. 681-756. Springer Netherlands;
- GRAZIA, J., Schuh, R. T., & Wheeler, W. C. (2008). Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). *Cladistics*, 24(6), 932-976;
- GREENSTONE, M. H.; TILLMAN, P. G.; HU, J. S. (2014) Predation of the newly invasive pest *Megacopta cribraria* (Hemiptera: Plataspidae) in soybean habitats adjacent to cotton by a complex of predators. *Journal of Economic Entomology*, v. 107, n. 3, p. 947-954, 2014.
- GUINDON S. & Gascuel O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- GWIAZDOWSKI, Rodger A. *et al.* (2015) The Hemiptera (Insecta) of Canada: constructing a reference library of DNA barcodes. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0125635, 2015.
- HEBERT P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* (2004); 2(10):e312. doi: 10.1371/journal.pbio.0020312 PMID: 15455034; PubMed Central PMCID: PMC518999.
- HEBERT, P.D.N. *et al.* (2016) Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 371, n. 1702, p. 20150333, 2016.
- HEBERT, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes *Proc. R. Soc. Lond. B* 2003 270 313-321;
- HENDRICH L., Balke M. (2011) A simultaneous journal/wiki publication and dissemination of a new species description: *Neobidessodes darwiniensis* sp. n. from northern Australia (Coleoptera, Dytiscidae, Bidessini). *ZooKeys* 79: 11– 20.
- HENRY, T.J. (1997) Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 275–301.
- HOSOKAWA, T., Kikuchi, Y., Shimada, M., & Fukatsu, T. (2007). Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1621), 1979-1984;
- KARP A, Edwards K, Bruford M, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A, Boursot P, Arctander P, Tautz D and Hewitt G (1997) Newer molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol* 15:625-628

- KATTI, Gururaj *et al.* Biological control of insect pests of rice. Rajendranagar, Hyderabad, AP, India: Directorate of Rice Research, v. 22, 2007.
- Korf, R. P. (2005). Reinventing taxonomy: a curmudgeon's view of 250 years of fungal taxonomy, the crisis in biodiversity, and the pitfalls of the phylogenetic age. *Mycotaxon*, 93, 407-416.
- KUMAR S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- KVIST, Sebastian. Barcoding in the dark? a critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 69, n. 1, p. 39-45, 2013.
- MEIKLEJOHN KA, Wallman JF, Dowton M (2011) DNA-based identification of forensically important Australian Sacrophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine* 125: 27–32.
- MEMON, N., Meier, R., Manan, A., & SU, K. F. Y. (2006). On the use of DNA sequences for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bug genus *Halys* (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. *Systematic Entomology*, 31(4), 703-710.
- MESQUITA, Rafael D. *et al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 48, p. 14936-14941, 2015.
- NEI M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NEIGEL J, Domingo A, Stake J (2007) DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs* 26: 487–499.
- PANIZZI, A.R. & Grazia, J. (2015) Introduction to True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. *True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics* (ed. by A.R. Panizzi & J. Grazia) pp. 3-20. Springer Netherlands;
- PANIZZI, Antônio R. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. *Annual review of entomology*, v. 42, n. 1, p. 99-122, 1997.
- PARK, Doo-Sang *et al.* (2011) Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *PLoS One*, v. 6, n. 4, p. e18749, 2011.

- RATNASINGHAM S, Hebert PDN (2007) The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, (www.barcodinglife.org) 7: 355–364.
- RIDER, D.A. (2016) Pentatomoidea Home page. North Dakota State University. <http://www.ndsu.nodak.edu/ndsu/rider/Pentatomoidea/> [accessed on 01 May, 2017];
- SAVOLAINEN, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811;
- SCHUH, R. T., 1986. The influence of cladistics on heteropteran classification. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 67-93.
- SCHUH RT. 1991. Phylogenetic, host, and biogeographic analyses of the Pilophorini (Heteroptera Miridae Phylinae). *Cladistics* 7:157–90
- SCHUH, R. T., & Slater, J. A. (1995). *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history*. Cornell UNIVERSITY press.
- SCHUH, Randall T.; WEIRAUCH, Christiane; WHEELER, Ward C. Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis. *Systematic Entomology*, v. 34, n. 1, p. 15-48, 2009.
- SIGSGAARD, Lene. Early season natural control of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: the contribution and interaction of two spider species and a predatory bug. *Bulletin of entomological research*, v. 97, n. 5, p. 533-544, 2007.
- STOEV P, Akkari N, Zapparoli M, Porco D, Enghoff H, *et al.* (2010) The centipede genus *Eupolybothrus* Verhoef, 1907 (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae) in North Africa, a cybertaxonomic revision, with a key to all species in the genus and the first use of DNA barcoding for the group. *ZooKeys* 50: 29–77.
- TAMURA K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- TILLMAN, P.G.; Greenstone, Matthew H.; HU, Jing S. (2015) Predation of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by a complex of predators in cotton and adjoining soybean habitats in Georgia, USA. *Florida entomologist*, v. 98, n. 4, p. 1114-1126, 2015.
- WARD RD, Homes BH, White WT, Last PR (2008) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59: 57–71.

- WARD, Robert D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.
- WEILER, L., Ferrari, A., & Grazia, J. (2016). Phylogeny and biogeography of the South American subgenus *Euschistus* (*Lycipta*) Stål (Heteroptera: Pentatomidae: Carpocorini). *Insect Systematics & Evolution*, 47(4), 313-346;
- WEIRAUCH, Christiane. From four-to three-segmented labium in Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, v. 48, n. 2, p. 331-344, 2008.
- WEIRAUCH, Christiane; SCHUH, Randall T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. *Annual review of Entomology*, v. 56, p. 487-510, 2011.
- WESENER T, Raupach MJ, Decker P (2011) Mountain refugia play a role in soil arthropod speciation on Madagascar: a case study of the endemic Giant firemillipede genus *Aphistogoniulus*. *Public Library of Science ONE* 6: e28035.
- WHEELER WC, Schuh RT, Bang R. 1993. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Entomol. Scand.* 24:121–37
- WILL KP, Mishler PD, Wheeler QD (2005) The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.
- WU, Y.Z., Yu, S.S., Wang, Y.H. *et al.* (2016) The evolutionary position of Lestoniidae revealed by molecular autapomorphies in the secondary structure of rRNA besides phylogenetic reconstruction (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 177, 750–763.
- ZHU, Pingyang *et al.* Selection of nectar plants for use in ecological engineering to promote biological control of rice pests by the predatory bug, *Cyrtorhinus lividipennis*, (Heteroptera: Miridae). *PloS one*, v. 9, n. 9, p. e108669, 2014.

ANEXO A – Tabela de indivíduos (*Acession Number*, Localidade)

Nº	Indivíduos
1	<i>Carpocoris_mediterraneus</i> COI-5P-609pb JN871544.1 França
2	<i>Carpocoris_purpureipennis</i> COI-5P-610pb JN871520.1 França
3	<i>Coenus_delius</i> COI-5P-576pb KR043333.1 Canadá
4	<i>Dichelops_melacanthus</i> COI-5P-644pb JQ218458.1 Brasil
5	<i>Dolycoris_baccarum</i> COI-5P-556pb KY841914.1 Paquistão
6	<i>Euschistus_conspersus</i> COI-5P-528pb KR044644 CNCHA1118-11 Canadá
7	<i>Euschistus_conspersus</i> COI-5P-576pb KR567504 BBHCM276-10 Canadá
8	<i>Euschistus_crassus</i> COI-5P-792pb KJ642002.1 Estados Unidos
9	<i>Euschistus_crassus</i> COI-5P-792pb KJ642003.1 Estados Unidos
10	<i>Euschistus_ictericus</i> COI-5P-658pb BBHMA169-12 Estados Unidos
11	<i>Euschistus_ictericus</i> COI-5P-658pb KR030528 BBHMA547-12 Estados Unidos
12	<i>Euschistus_ictericus</i> COI-5P-658pb KR043783 BBHMA544-12 Estados Unidos
13	<i>Euschistus_ictericus</i> COI-5P-658pb KR562037 HMCN375-08 Canadá
14	<i>Euschistus_ictericus</i> COI-5P-658pb KR578901 HMCN376-08 Canadá
15	<i>Euschistus_obscurus</i> COI-5P-633pb PHFLO043-10 Estados Unidos
16	<i>Euschistus_obscurus</i> COI-5P-658pb BBHMA535-12 Estados Unidos
17	<i>Euschistus_obscurus</i> COI-5P-658pb BBHMA550-12 Estados Unidos
18	<i>Euschistus_obscurus</i> COI-5P-658pb CNCHA1125-11 Estados Unidos
19	<i>Euschistus_obscurus</i> COI-5P-658pb INFL028-08 Estados Unidos
20	<i>Euschistus_quadrator</i> COI-5P-525pb JX548475.1 Estados Unidos
21	<i>Euschistus_quadrator</i> COI-5P-792pb KJ642008.1 Estados Unidos
22	<i>Euschistus_quadrator</i> COI-5P-792pb KJ642009.1 Estados Unidos
23	<i>Euschistus_quadrator</i> COI-5P-792pb KJ642010.1 Estados Unidos
24	<i>Euschistus_servus_euschistoides</i> COI-5P-658pb KR040264 CNCHA315-11 Canadá
25	<i>Euschistus_servus_servus</i> COI-5P-658pb HQ105674 HCNCS392-09 Canadá
26	<i>Euschistus_servus</i> COI-5P-653pb HQ105675 HCNCS391-09 Canadá
27	<i>Euschistus_servus</i> COI-5P-653pb HQ105677 HCNCS388-09 Canadá
28	<i>Euschistus_servus</i> COI-5P-654pb HQ105676 HCNCS390-09 Canadá
29	<i>Euschistus_servus</i> COI-5P-658pb HQ105678 HCNCS389-09 Canadá
30	<i>Euschistus_servus</i> COI-5P-660pb KR045133 OAAS084-12 Canadá
31	<i>Euschistus_tristigmus_luridus</i> COI-5Ppb KR583943 HMCN132-08 Canadá
32	<i>Euschistus_tristigmus_luridus</i> COI-5P-607pb KR037264 BBPEC200-10 Canadá
33	<i>Euschistus_tristigmus_luridus</i> COI-5P-612pb HQ930525 BBPEC201-10 Canadá
34	<i>Euschistus_tristigmus_luridus</i> COI-5P-618 KR565527 BBHCM277-10 Canadá
35	<i>Euschistus_tristigmus_luridus</i> COI-5P-658pb GU692435 BBPEC077-09 Canadá
36	<i>Euschistus_tristigmus</i> COI-5P-636pb KU601529.1 Estados Unidos
37	<i>Euschistus_tristigmus</i> COI-5P-642pb KU601527.1 Estados Unidos
38	<i>Euschistus_tristigmus</i> COI-5P-650pb KU601525.1 Estados Unidos
39	<i>Euschistus_tristigmus</i> COI-5P-663pb KU601526.1 Estados Unidos
40	<i>Euschistus_tristigmus</i> COI-5P-792pb KJ642016.1 Estados Unidos
41	<i>Euschistus_variolarius</i> COI-5P-576pb SMTPO4726-15 Canadá
42	<i>Euschistus_variolarius</i> COI-5P-579pb SMTPO4013-15 Canadá
43	<i>Euschistus_variolarius</i> COI-5P-588pb RRSSA2062-15 Canadá
44	<i>Euschistus_variolarius</i> COI-5P-636pb KR562288 BBHCM558-10 Canadá
45	<i>Euschistus_variolarius</i> COI-5P-658pb KR038010 CNCHA316-11 Canadá
46	<i>Hymenarcys_nervosa</i> COI-5P-658pb KR036682.1 Canadá
47	<i>Proxys_albopunctulatus</i> COI-5P-641pb JQ218467.1 Brasil
48	<i>Proxys_punctulatus</i> COI-5P-792pb KJ642021.1 Estados Unidos

ANEXO B – Árvore Filogenética de maior verossimilhança (ln-2627.7594)



