



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL BOZINI GALLO

**“CITOGENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO  
DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMATIDAE  
(INSECTA: HETEROPTERA)”**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

RAQUEL BOZINI GALLO

**“CITOGENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO  
DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMATIDAE  
(INSECTA: HETEROPTERA)”**

RAQUEL BOZINI GALLO

**“CITOGENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO  
DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMATIDAE  
(INSECTA: HETEROPTERA)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata da Rosa.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gallo, Raquel.

CITOGENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMATIDAE (INSECTA: HETEROPTERA) / Raquel Gallo. - Londrina, 2016.  
65 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética - Teses. 2. Genética Molecular - Teses. 3. Insetos - Teses. I. da Rosa, Renata . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

RAQUEL BOZINI GALLO

**“CITOGENÉTICA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA  
EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMATIDAE (INSECTA:  
HETEROPTERA) ”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>fa</sup> Dr<sup>a</sup>. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>fa</sup> Dr<sup>a</sup>. Lucia Giuliano Caetano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>fa</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina Almeida  
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

Londrina, 25 de fevereiro de 2016.

*Dedico este trabalho à Deus, que com sua infinita bondade me concede  
graças inimagináveis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Programa de Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de aprimorar minha formação intelectual e profissional e por todo respaldo oferecido pela coordenação do curso.

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

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento.

À professora Dr<sup>a</sup> Renata da Rosa, por me confiar este trabalho e por todo o aprendizado.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Dias e Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano, por toda a ajuda em coletas e no desenvolvimento geral do trabalho.

Ao professor Dr. Laurival Vilas-Boas e toda equipe do Laboratório de taxonomia de bactérias/Bioinseticida, pela fundamental parceria neste trabalho e apoio em todos os sentidos.

Ao professor Dr. Mario Luis Orsi e aos colegas do Laboratório de Ecologia de peixes e Invasão Biológica, por toda ajuda e principalmente pela amizade.

Aos técnicos Dario, Melissa pela ajuda constante e fundamental. Ao técnico Edie por toda a ajuda em coletas e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal, Angélica, Mariana, Matheus, Juceli, Ana Beatriz, Fabio, Jaqueline, Larissa e Thayná, pela convivência e amizade.

Às minhas amigas Poliana e Rachel, por toda ajuda, principalmente pelo apoio emocional e pela amizade profunda e verdadeira que levarei por toda a vida.

Aos meus irmãos mais novos Gabriel e Heloisa, que me orgulham, me incentivam e me fazem acreditar sempre em mim. E minha irmã mais velha Mariana, que me deu suporte em todos os momentos e me acompanhou em todos os passos da caminhada segurando minha mão.

Agradeço imensamente a meus pais que desde sempre tiraram de si mesmos para me dar, e nada do que eu faça pagará um dia por tudo o que se sacrificaram para que eu pudesse escrever esse trabalho.

Ao meu namorado André pelo companheirismo, compreensão e por ser meu melhor calmante.

Acima de tudo agradeço à DEUS, por seu amor incondicional

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

Muito obrigada.

GALLO, Raquel Bozini. **Citogenética molecular aplicada ao estudo da evolução cariotípica em belostomatidae (insecta: heteroptera)**. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O gênero *Belostoma*, família Belostomatidae, inclui os maiores heterópteros e seus representantes possuem hábitos aquáticos e predatórios desempenhando papel importante como agentes de controle biológico. Esse gênero é bastante numeroso e apresenta dúvidas sobre sua evolução cariotípica, que envolve eventos de agmatoploidia e simploidia cromossômicas, bem como sistemas múltiplos e simples de determinação cromossômica do sexo. Neste trabalho foram analisadas oito espécies do gênero *Belostoma* (*B. candidulum*, *B. cummingsi*, *B. dentatum*, *B. dilatatum*, *B. elongatum*, *B. horvathi*, *B. testaceopallidum* e *Belostoma* sp 1) de diferentes localidades do Brasil. As análises meióticas revelaram cariótipos de  $2n = 14+XY$  para *B. horvathi*,  $2n = 22+XY$  para *B. cummingsi*,  $2n = 26+X_1X_2Y$  para *B. dentatum*, *B. elongatum* e *Belostoma* sp 1 e  $2n = 26+X_1X_2X_3Y$  para *B. testaceopallidum*. Todas as espécies apresentaram cromossomos holocinéticos. Foram observadas diferenças na distribuição da heterocromatina entre as espécies bem como a composição de bases dos blocos heterocromáticos (CMA<sub>3</sub>/DAPI). A sequência de DNAr 18S foi extraída de *B. horvathi* e utilizada como sonda, esta apresentou alta similaridade com outras sequências depositadas no NCBI. Os *clusters* de DNAr 18S foram evidenciados tanto nos cromossomos sexuais quanto nos autossomos, formando assim quatro padrões: i) nas espécies com sistema sexual simples *B. candidulum* e *B. horvathi* foram encontrados blocos nos cromossomos sexuais, ii) nas espécies com sistema sexual múltiplo *B. dentatum*, *B. dilatatum*, *B. elongatum* e *B. testaceopallidum* os genes de DNAr 18S foram evidenciados em um par de autossomos iii) a espécie *B. cummingsi* que possui sistema sexual simples apresentou marcações em um par de autossomos e um cromossomo sexual, iv) e a espécie *B. discretum* possui sistema sexual múltiplo e apresentou blocos em dois cromossomos sexuais. Os dados do presente trabalho e os da literatura nos levaram a propor uma nova hipótese de evolução para o grupo, com um cariótipo ancestral com número diploide baixo, sistema simples de determinação sexual e Região Organizadora de Nucléolo (RON) nos cromossomos sexuais. A partir desse cariótipo teriam sido formados os demais cariótipos a partir de eventos de agmatoploidias, simploidias e movimentação do DNAr 18S. Esses eventos puderam ser confirmados pela análise da heterocromatina por bandamento-C e pela técnica de *C<sub>0</sub>t-1*. O cromossomo X de *B. horvathi* foi microdissectado e amplificado, e utilizado como sonda para a análise de similaridade dos cromossomos sexuais entre as espécies. A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) realizada com a sonda gerada a partir do cromossomo X, apresentou hibridização uniforme por todo o corpo heteropicnótico positivo correspondente ao cromossomo X em intérfase quando hibridizada na espécie de origem, e quando hibridizada na espécie *B. dentatum* apresentou marcações discretas, podendo ser um indício de divergências na composição dos cromossomos X entre as espécies com diferentes sistemas de determinação sexual. Os dados do presente estudo ampliam o conhecimento sobre o grupo, trazendo novas informações e uma nova hipótese de evolução cariotípica para o grupo.

**Palavras-chave:** Citogenética. DNAr. Evolução cariotípica. Cromossomos sexuais.

GALLO, Raquel Bozini. **Molecular cytogenetics applied to the study of karyotype evolution in belostomatidae (insect: heteroptera)**. 2016. 44p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### ABSTRACT

The genus *Belostoma*, Belostomatidae family, includes the largest heteropteran and their representatives have aquatic and predatory habits playing an important role as biological control agents. This genus is quite large and has doubts about its karyotype evolution, which involves chromosomal agmatoploidy and simploidy events as well as multiple and simple chromosomal sex determination systems. This study analyzed eight species of the genus *Belostoma* (*B. candidulum*, *B. cumingsi*, *B. dentatum*, *B. dilatatum*, *B. elongatum*, *B. horvathi*, *B. testaceopallidum* and *Belostoma* sp 1) from different locations. The meiotic analysis revealed karyotype  $2n = 14 + XY$  to *B. horvathi*,  $2n = 22 + XY$  to *B. cummingsi*,  $2n = 26 + X_1X_2Y$  to *B. dentatum*, *B. elongatum* and *Belostoma* sp 1 and  $2n = 26 + X_1X_2X_3Y$  to *B. testacopallidum*. All species showed holokinetic chromosomes. The sequence of 18S rDNA extracted from *B. horvathi* showed high similarity to other sequences deposited in the NCBI and was used as a probe. Differences were observed in the distribution of heterochromatin between species and the composition of bases of heterochromatic blocks (CMA<sub>3</sub> / DAPI). The 18S rDNA clusters were evident in both sex chromosomes and in the autosomes, thus forming four patterns: i) the species with simple sexual system *B. candidulum*. and *B. horvathi* were found blocks in sex chromosomes, ii) the species with multiple sexual system *B. dentatum*, *B. dilatatum*, *B. elongatum* and *B. testaceopallidum* 18S rDNA genes were found in a pair of autosomes iii) the species *B. cummingsi* that has simple sexual system showed markings on a pair of autosomes and one sex chromosome iv) and *B. discretum* has multiple sexual system and blocks presented in two sex chromosomes. The present data and the literature led us to propose a new hypothesis of evolution for the group, with an ancestral karyotype with low diploid numbers, simple system of sex determination and the Nucleolar Organizing Region (NOR) in the sex chromosomes. From that karyotype have been formed other karyotypes from agmatoploidy events, simploidy and movement of the 18S rDNA. These events could be confirmed by analysis of heterochromatin by C-banding and by *Cot*-1 technique. The X chromosome of *B. horvathi* was microdissected and amplified, and used as a probe for the analysis of sex chromosomes similarity between species. The fluorescence in situ hybridization (FISH), performed with the probe generated from the X chromosome, hybridization was uniformly throughout the body heteropycnotic positive corresponding to the X chromosome in the interphase when hybridized species of origin, and when hybridized the specie *B. dentatum* presented discrete markings, may be an indication of differences in the composition of X chromosomes between species with different sex determination systems. The data from this study extend the knowledge of the group, bringing new information and a new hypothesis karyotype evolution for the group.

**Key words:** Cytogenetics. rDNA. Karyotype evolution. Sex chromosomes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Filogenia das infraordens de Heteroptera com base em caracteres morfológicos e moleculares .....	15
<b>Figura 2</b> – Esquema hipotético da evolução cariotípica em espécies do gênero <i>Belostoma</i> .....	22

### Artigo científico

<b>Figura 1</b> – Fases meióticas e mitóticas com coloração convencional e com fluorocromos base específicos (CMA <sub>3</sub> /DAPI) de três espécies do gênero <i>Belostoma</i> . <b>a – d)</b> <i>Belostoma horvathi</i> . <b>a.</b> Diplóteno/Diacinese parcial <b>b.</b> Metáfase I <b>c.</b> Metáfase mitótica <b>d.</b> Metáfase mitótica; <b>e – h)</b> <i>B. cummingsi</i> . <b>e.</b> Diplóteno/Diacinese incompleta <b>f.</b> Metáfase II <b>g.</b> Metáfase II <b>h.</b> Metáfase II; <b>i – l)</b> <i>B. candidulum</i> <b>i.</b> Diplóteno/Diacinese parcial <b>j.</b> Metáfase I <b>k.</b> Metáfase II <b>l.</b> Metáfase II. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI <sup>+</sup> . Os asteriscos indicam os blocos CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> .....	46
<b>Figura 2</b> – Fases meióticas com coloração convencional e com fluorocromos base específicos (CMA <sub>3</sub> /DAPI) de três espécies do gênero <i>Belostoma</i> . <b>a – d)</b> <i>Belostoma dentatum</i> . <b>a.</b> Diplóteno/Diacinese <b>b.</b> Metáfase II <b>c.</b> MetáfaseII <b>d.</b> MetáfaseII; <b>e – h)</b> <i>B. elongatum</i> . <b>e.</b> Diplóteno/Diacinese <b>f.</b> Metáfase II, <b>g.</b> Diplóteno/Diacinese parcial <b>h.</b> Diplóteno/Diacinese parcial; <b>i – j)</b> <i>Belostoma discretum</i> <b>i.</b> Diplóteno/Diacinese <b>j.</b> Metáfase II. (Nos quadros pequeno cromossomo autossômico em evidência). As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI <sup>+</sup> . Os asteriscos indicam os blocos CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> .....	47
<b>Figura 3</b> – Fases meióticas com coloração convencional, fluorocromos base específicos (CMA <sub>3</sub> /DAPI) e Hibridização fluorescente <i>in situ</i> com sonda da porção C <sub>0</sub> t-1 isolada de <i>Belostoma dentatum</i> , de duas espécies do gênero <i>Belostoma</i> . <b>a – d)</b> <i>Belostoma testaceopallidum</i> . <b>a.</b> Diplóteno/Diacinese <b>b.</b> Metáfase II parcial <b>c.</b> Metáfase II <b>d.</b> Metáfase II; <b>e – h)</b> <i>B. dilatatum</i> . <b>e.</b> Diplóteno/Diacinese parcial <b>f.</b> Metáfase II <b>g.</b>	

Metáfase II **h.** Metáfase II; **i.** Metáfase II de *Belostoma horvathi*. **j.** Metáfase II de *B. dentatum*; **k.** Diplóteno/Diacinese de *B. dentatum*. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI<sup>+</sup>. Os asteriscos indicam os blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> ..... 48

**Figura 4** – Hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S. **a.** Metáfase II de *B. horvathi*. **b.** Metáfase II de *B. candidulum*. **c.** Metáfase II de *B. cummingsi*. **d.** Metáfase II de *B. dentatum*. **e.** Metáfase II de *B. testaceopallidum*. **f.** Metáfase II de *B. dilatatum*. **g.** Metáfase II de *Belostoma discretum*. **h.** Metáfase mitótica de *B. elongatum* (nos quadros: paquíteno e núcleo interfásico). As setas indicam os *clusters* de DNAr 18S. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais ..... 49

**Figura 5** – Hibridização fluorescente *in situ* com sonda do cromossomo X microdissectado de *B. horvathi*. **a,b.** Paquíteno inicial de *B. horvathi*. **c,d.** Paquíteno inicial de *B. dentatum*. As setas indicam o bloco heteropicnótico correspondente ao cromossomo X ..... 50

**Figura 6** – Esquema representativo da nova hipótese de evolução cromossômica para o gênero *Belostoma* ..... 51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados dos sistemas de determinação sexual e localização de DNAr 18S no gênero <i>Belostoma</i> .....	43
<b>Tabela 2</b> – Espécies estudadas e seus respectivos locais de coleta .....	45

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos taxonômicos e biológicos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspectos citogenéticos</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>DNA Repetitivo</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Cromossomos sexuais</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>RESUMO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>59</b>
	APÊNDICE A – Sequencia consenso do fragmento contido no clone 11, isolado da porção C0t-1 .....	<b>60</b>
	APÊNDICE B – BLAST® Basic Local Alignment Search Tool .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 Ecosistemas aquáticos são parte fundamental de uma rede de interação  
4 entre compartimentos terrestres e aquáticos, com organismos co-existindo nos dois ambientes.  
5 A comunidade de macroinvertebrados bentônicos é componente importante do sedimento de  
6 rios e lagos, atuando como parte fundamental na dinâmica de nutrientes, transformação de  
7 matéria e fluxo de energia (CALLISTO et al., 2001). Os macroinvertebrados aquáticos  
8 apresentam uma grande diversidade taxonômica com representantes das classes Insecta,  
9 Acarina, Crustacea, Gastropoda, entre outros (GULLAN; CRANSTON, 2008), sendo que, de  
10 maneira geral, os insetos compreendem cerca de 75% de todos os organismos vivos do  
11 planeta (RESH; CARDÉ, 2009).

12 O sucesso adaptativo dos insetos pode ser visto por sua diversidade e  
13 abundância, ampla distribuição e sua habilidade em colonizar a maior parte dos habitats  
14 (RESH; CARDÉ, 2009). Dentre esses insetos destaca-se a subordem Heteroptera (ordem  
15 Hemiptera) que possui mais de 38 mil espécies descritas distribuídas por todo o globo com  
16 maior abundância em regiões tropicais e subtropicais (SCHUH; SLATER, 1995). A família  
17 Belostomatidae é uma das maiores de Heteroptera e seus representantes são comumente  
18 conhecidos como “baratas d’água”. São insetos com hábitos aquáticos e predatórios e  
19 desempenham papel de agentes de biocontrole em seu habitat (SAHA et al., 2010).

20 Apesar da grande importância ecológica, os estudos sobre a organização  
21 cromossômica são escassos frente à diversidade do grupo, e pouco se sabe sobre a  
22 organização estrutural dos cromossomos de Belostomatidae. Todas as espécies analisadas até  
23 o momento apresentaram cromossomos holocinéticos, ou seja, cromossomos com cinetócoro  
24 difuso, característica comum a todos os heterópteros (PAPESCHI; BRESSA, 2006). O  
25 número diploide observado varia entre  $2n = 4$  em *Lethocerus* sp. (CHICKERING, 1927,  
26 1932) e  $2n = 30$  em diferentes espécies do gênero *Belostoma* (BARDELLA et al., 2012), e um  
27 cariótipo modal de  $2n = 29 = 26+X_1X_2Y$  (machos) (CHIRINO et al., 2013; CHIRINO;  
28 BRESSA, 2014). As espécies estudadas apresentaram sistema cromossômico de determinação  
29 sexual, sendo que dentro do gênero *Belostoma*, foram descritos três sistemas de determinação  
30 do sexo diferentes: XX/XY;  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  e  $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y$  (BARDELLA et  
31 al., 2012; CHIRINO et al., 2013; CHIRINO; BRESSA, 2014).

32 Os dados sobre a família Belostomatidae são praticamente restritos à  
33 estudos convencionais. As análises moleculares, como a localização de DNA ribossômico  
34 18S, são escassas e foram aplicadas em apenas oito espécies (CHIRINO et al., 2013;  
35 CHIRINO; BRESSA, 2014). A organização em clusters dos DNAs ribossômicos faz com que  
36 sejam marcadores cromossômicos facilmente detectáveis e úteis na elucidação de problemas  
37 taxonômicos, de organização genômica e variações cariotípicas (CABRAL-DE-MELLO et  
38 al., 2011), podendo assim ajudar na compreensão da origem e evolução dos cromossomos em  
39 diferentes espécies.

40 Principalmente devido à grande variedade de cariótipos dentro da família  
41 Belostomatidae, e a pequena quantidade de estudos a respeito, ainda existem dúvidas sobre  
42 sua evolução cariotípicas. O pouco conhecimento de sua organização genômica, como a  
43 localização dos DNAr e a formação e manutenção dos diferentes sistemas de determinação  
44 sexual são questões interessantes a serem elucidadas. A associação das análises convencionais  
45 e moleculares de novas espécies, com os dados já existentes na literatura, pode trazer a  
46 confirmação de hipóteses evolutivas, bem como o enriquecimento do conhecimento sobre o  
47 grupo.

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

## 65 2 REVISÃO DE LITERATURA

66

### 67 2.1 Aspectos taxonômicos e biológicos

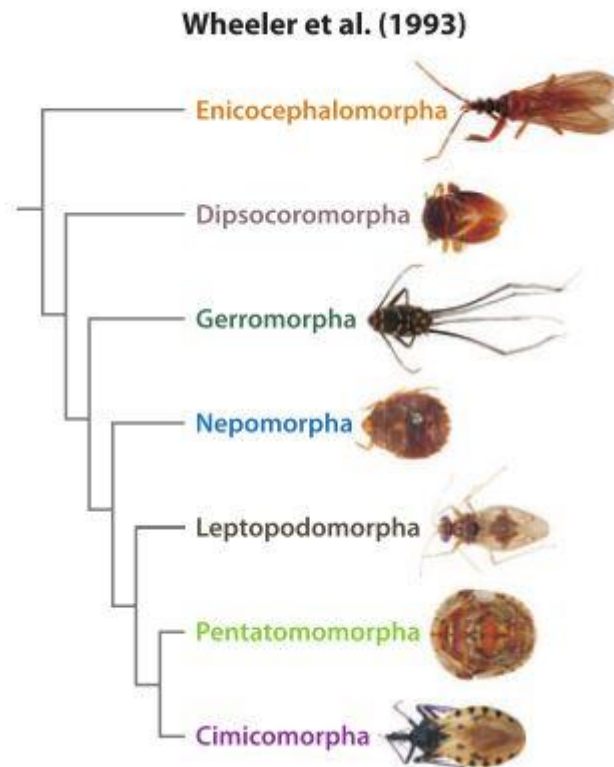
68

69 Hemiptera, o quinto maior grupo dos insetos (SCHUH; SLATER, 1995),  
70 com cerca de 82.000 espécies descritas (ARNETT, 2000) é uma ordem de parametábulos  
71 distinguidos principalmente por sua peça bucal sugadora única, com hábitos alimentares  
72 variando de fitofagia a predação, incluindo ectoparasitismo e hematofagia (FORERO, 2008).

73 Por muito tempo foi aceito que Hemiptera possuía duas subordens,  
74 Heteroptera e Homoptera (BORROR; WHITE, 1970; BORROR et al, 1981) e evidências  
75 morfológicas ressaltavam que Homoptera era provavelmente parafilético ou que seu  
76 monofiletismo não era bem documentado (SCHLEE, 1969). Até o presente momento a  
77 proposta mais aceita é a que a ordem Hemiptera seja composta pelas subordens  
78 Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha e Heteroptera (WEIRAUCH; SCHUH,  
79 2011).

80 O estudo realizado por Wheeler et al. (1993) é o mais aceito sobre o número  
81 de infraordens de Heteroptera e a relação filogenética entre elas, uma vez que traz dados  
82 morfológicos e moleculares utilizando 29 espécies. Seus resultados corroboram o proposto  
83 por Schuh (1979), discordando apenas da posição de Leptodopodomorpha, considerado por  
84 Wheeler et al. (1993) como grupo irmão de Cimicomorpha + Pentatomomorpha (Fig. 1).  
85 Sendo assim, as sete infraordens de Heteroptera são Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha,  
86 Gerromorpha, Nepomorpha, Leptodopodomorpha, Pentatomomorpha e Cimicomorpha  
87 (WEIRAUCH; SCHUH, 2011) (Fig. 1).

88 A família Belostomatidae Leach, 1815, uma das famílias de Nepomorpha, é  
89 composta por aproximadamente 150 espécies descritas. Lauck e Menke (1961) subdividiram  
90 Belostomatidade em 3 subfamílias, Horvathiniinae, Lethocerinae e Belostomatinae, utilizando  
91 para isso aspectos da morfologia da genitália masculina e algumas outras características  
92 morfológicas complementares.



93

**Figura 1** – Filogenia das infraordens de Heteroptera com base em caracteres morfológicos e moleculares

94

95

**Fonte:** (WEIRAUCH; SCHUH, 2011)

96

No Brasil a subfamília Horvathiniinae é representada apenas por *Horvathinae* Montadon, 1911, a subfamília Lethocerinae por *Lethocerus* Mayr, 1853, (RIBEIRO, 2005) e a subfamília Belostomatinae compreende seis dos oito gêneros descritos de Belostomatídeos: *Abedus*, *Belostoma*, *Diplonychus*, *Lymnogeton*, *Hydrocyrius* e *Weberella* (LAUCK; MENKE, 1961; RIBEIRO, 2007; RIBEIRO; ALECRIM, 2008). O gênero mais diverso da subfamília Belostomatinae é o gênero *Belostoma* Latreille, 1807, que inclui 74 espécies descritas (RIBEIRO, 2007), com grande representação na Região Tropical da América do Sul, principalmente na Colômbia, Brasil, Argentina e Chile (CHIRINO et al, 2013)

105

Algumas características acentuadas podem ser ressaltadas neste grupo, como o formato do corpo largo e ovalado, pernas modificadas para agarrar e um par de garras reduzidas. Quanto ao comportamento reprodutivo, outra característica marcante, é o cuidado parental dos ovos, desempenhado pelo macho. (GULLAN; CRANSTON, 2008; RESH; CARDÉ, 2009).

109

110 Os belostomatídeos são insetos com hábitos aquáticos e predatórios,  
111 podendo se alimentar de larvas, girinos, pequenos peixes e, até mesmo, pequenos anfíbios,  
112 desempenhando assim um importante papel como agentes de controle biológico (SAHA et al.,  
113 2010). Esses macroinvertebrados bentônicos, são integrantes importantes nas comunidades de  
114 rios, riachos e lagoas, pois, além de exercerem papel de reguladores do sistema através da  
115 predação, servem ainda de alimento para peixes e participam do fluxo de energia e da  
116 ciclagem de nutrientes (ABÍLIO et al., 2007), o que os torna objeto interessante para estudos  
117 relacionados com ecologia, sistemática e genética.

118

## 119 2.2 Aspectos citogenéticos

120 De todos os Heterópteros estudados, aproximadamente 1600 espécies  
121 possuem dados citogenéticos, correspondendo a 4,2% das espécies descritas e dentre essa  
122 pequena porcentagem, apenas 29 espécies de Belostomatidae possuem análises  
123 cromossômicas, sendo a maioria restrita a análise convencional (PAPESCHI, 1988, 1994,  
124 1996; BARDELLA et al., 2012). Os dados citogenéticos existentes para a família revelam que  
125 a maioria das espécies apresenta indivíduos machos com número cromossômicos variando de  
126  $2n = 4$  em *Lethocerus* sp. (CHICKERING, 1927, 1932) a  $2n = 30$  em diferentes espécies do  
127 gênero *Belostoma* (BARDELLA et al, 2012).

128 Na maioria dos Eucariotos as proteínas do cinetócoro ligam-se ao  
129 cromossomo concentradas em um único local, o centrômero ou constrição primária. Em  
130 alguns grupos, essas proteínas ligam-se ao longo de todo o comprimento do cromossomo, são  
131 os chamados cromossomos holocinéticos caracterizados pela ligação dispersa das proteínas do  
132 cinetócoro e não formação da constrição primária (GUERRA et al., 2010). Esta disposição  
133 cinetocórica parece favorecer que eventos de fissão e fusão cromossômica sejam mais  
134 facilmente aceitos, além de permitir que eventuais fragmentações cromossômicas  
135 permaneçam viáveis em subseqüentes divisões celulares. Desta maneira, a variação  
136 cromossômica numérica inter e intraespecífica é selecionada positivamente se fixando nas  
137 populações (HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; MELTERS et al., 2012).

138 Os cromossomos holocinéticos foram observados em plantas, insetos,  
139 aracnídeos e nematóides (MELTERS et al., 2012). O fato de que os mais diferentes  
140 organismos possuem cromossomos holocinéticos e considerando a presença de cromossomos

141 monocêntricos no último ancestral comum de todos os eucariotos, como uma hipótese mais  
142 parcimoniosa, Melters et al. (2012) sugeriram que os cromossomos holocinéticos surgiram  
143 independentemente 13 vezes durante a história evolutiva dos eucariotos. No reino Animal os  
144 cromossomos holocinéticos surgiram nove vezes, sendo uma no filo Nematoda e oito no filo  
145 Arthropoda (MELTERS et al., 2012).

146 Em todos os organismos com cromossomos holocinéticos, algumas  
147 características podem ser observadas, como a ausência de constrição primária em prometáfase  
148 e metáfase e migração paralela das cromátides em anáfase mitótica (GUERRA et al., 2006).  
149 Entretanto, na anáfase I da meiose, os cromossomos apresentam migração telocinética, e as  
150 extremidades funcionais a cada ciclo são ativadas de maneira aleatória (PÉREZ et al., 2000;  
151 MELTERS et al., 2012).

152 Geralmente cromossomos holocinéticos, como os de Belostomatidae,  
153 apresentam blocos heterocromáticos teloméricos, diferentemente do padrão heterocromático  
154 encontrado nos cromossomos monocêntricos, com heterocromatina pericentromérica e  
155 telomérica (MOLA; PAPESCHI, 2006). Os estudos sobre a heterocromatina em Heteroptera,  
156 revelam um padrão clássico de distribuição com blocos heterocromáticos teloméricos em  
157 todos ou alguns cromossomos, além de alguns blocos intersticiais correspondentes às RONS  
158 ou constrições nucleolares (PAPESCHI; BRESSA, 2006).

159 No gênero *Belostoma*, há diferenças quanto ao número e distribuição dos  
160 blocos heterocromáticos. *Belostoma dilatatum* e *Belostoma elongatum* apresentam blocos  
161 heterocromáticos terminais em todos os bivalentes com poucas marcações intersticiais  
162 (BARDELLA et al., 2012), *Belostoma gestroi* e *Belostoma orbiculatum* apresentam pequenas  
163 bandas terminais (CHIRINO; BRESSA, 2011; CHIRINO et al., 2013), *Belostoma candidulum*  
164 apresenta apenas um bloco heterocromático na região de associação dos cromossomos sexuais  
165 (BARDELLA et al., 2012) e *Belostoma bifoveolatum* e *Belostoma discretum* possuem bandas  
166 conspícuas terminais nos autossomos e os cromossomos Xs completamente heterocromáticos  
167 (CHIRINO; BRESSA, 2011).

168 A constituição da heterocromatina evidenciada pelos fluorocromos DAPI  
169 (regiões ricas em AT) e CMA<sub>3</sub> (regiões ricas em CG), mostra diferenças entre as espécies do  
170 gênero, onde são observadas espécies com apenas um bloco DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em um bivalente,  
171 como em *B. dilatatum*; espécies que apresentam blocos DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> nos cromossomos  
172 sexuais, como em *B. candidulum* (BARDELLA et al., 2012) e espécies que apresentam blocos

173 homogêneos para DAPI e CMA<sub>3</sub> exceto por possuírem um bloco DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em um  
174 bivalente médio e um bivalente grande respectivamente, como observado em *B. elongatum* e  
175 *B. gestroi* (CHIRINO et al., 2013).

176

### 177 **2.3 DNA repetitivo**

178 Além dos genes de cópia única, uma grande porção do genoma dos  
179 eucariotos é formada por elementos de DNA repetitivo, que pode estar organizado em  
180 repetições *in tandem* ou dispersas e ser altamente ou moderadamente repetitivo (CABRAL-  
181 DE-MELLO et al., 2010). O DNA moderadamente repetitivo tem como principais  
182 representantes as famílias multigênicas que codificam os RNAs ribossômicos (RNAr) e as  
183 histonas (BARDELLA, 2014; PIERCE, 2004). O DNA altamente repetitivo pode ser  
184 encontrado *in tandem* representado por microssatélites, minissatélites e DNAs satélite  
185 (DNAsat) e pode estar disperso pelo genoma como transposons e retrotransposons  
186 (CHARLESWORTH et al., 1994).

187 Os genes nucleares que codificam as moléculas de RNA ribossômico  
188 (RNAr) são distribuídos em duas famílias multigênicas no genoma: uma delas representada  
189 pelo DNA ribossômico (DNAr) 45S, composto pelos genes que transcrevem o RNAr 28S,  
190 RNAr 18S e RNAr 5,8S sendo estas sequencias separadas entre si por espaçadores transcritos  
191 internos (*ITS – Internal Transcribed Spacer ITS1 e ITS2*) (CABRAL-DE-MELLO et al.,  
192 2011) e cada *cluster*, ou unidade transcricional, de DNAr 45s separado por espaçadores  
193 transcritos externos (*ETS – External Transcribed Spacer*) (BARDELLA, 2014; PIERCE,  
194 2004). A outra família multigênica, corresponde ao gene que transcreve o RNAr 5s e as  
195 sequencias desse gene são separadas por espaçadores não transcritos (*NTS – Non-transcribed*  
196 *Spacer*) (LONG; DAWID, 1980; BARDELLA, 2014).

197 As famílias multigênicas podem estar organizadas em *clusters* separados ou  
198 associados, como já foi descrito em artrópodes, anelídeos, moluscos e peixes. A organização  
199 em clusters dos genes de RNAr faz deles marcadores cromossômicos facilmente detectáveis e  
200 de grande utilidade, ajudando a elucidar variações cariotípicas e organização genômica em  
201 diversos grupos de eucariotos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011; BARDELLA et al., 2013).

202 Estudos acerca da localização de DNAr em heterópteros têm evidenciado a  
203 presença de sítios tanto em autossomos quanto em cromossomos sexuais (CABRERO et al.,

204 2003; CATTANI et al., 2004; BARDELLA et al., 2010). Em Belostomatidae apenas oito  
205 espécies possuem dados sobre a localização e número de sítios de DNAr 18S. Em *B. oxyurum*  
206 e *B. candidulum* (CHIRINO; BRESSA, 2014) os sítios estão localizados nos cromossomos  
207 sexuais, em *B. elegans* em 1 par de autossomos (PAPESCHI; BRESSA, 2006), em  
208 *Lethocerus patruelis* foram encontradas marcações nos cromossomos sexuais  
209 (*B. dentatum*, *B. elongatum* e *B. gestroi* possuem 1 cluster  
210 localizado em um par de autossomos (CHIRINO et al., 2013). Dessa forma, é importante  
211 aumentar o número de estudos para auxiliar na resolução das questões evolutivas do grupo  
212 com proposições de possíveis hipóteses de diferenciação e evolução cariotípica.

213

#### 214 **2.4 Cromossomos sexuais**

215 Diversos grupos de eucariotos possuem sistema de determinação sexual  
216 diferenciado. Geralmente aceito que cromossomos sexuais diferenciados evoluem a partir de  
217 um par de autossomos após um membro desse par ter adquirido alguma função de  
218 determinação sexual (BRESSA et al, 2009). Em diversos organismos eucariotos os dois sexos  
219 possuem constituição cromossômica distinta. Na maioria dos casos um sexo é heterogamético  
220 e possui um par de cromossomos morfologicamente diferentes e o outro é homogamético e  
221 possui dois cromossomos idênticos. Os cromossomos sexuais diferenciados X e Y, por  
222 exemplo, são diferentes genética e morfologicamente (BACHTROG, 2006).

223 Um passo considerado importante na evolução de cromossomos sexuais é a  
224 restrição de recombinação. É um evento chave necessário para que ocorra sua diferenciação  
225 molecular e morfológica, resultando na degeneração progressiva do cromossomo presente  
226 apenas no sexo heterogamético, Y em sistemas com heterogamia masculina e o W em  
227 sistemas com heterogamia feminina (BACHTROG, 2006; BRESSA et al., 2009).

228 A maioria dos dados sobre evolução de cromossomos sexuais em insetos é  
229 obtida em Diptera e Lepidoptera. Nos dois grupos a meiose é aquiasmática no sexo  
230 heterogamético, conseqüentemente os cromossomos Y ou W são não recombinantes desde o  
231 princípio de sua diferenciação (TRAUT et al, 1999). Em Heteroptera a meiose é geralmente  
232 quiasmática em ambos os sexos, mas os cromossomos sexuais apresentam comportamento  
233 aquiasmático nos machos (TRAUT et al, 1999; BRESSA et al., 2009). Cromossomos sexuais  
234 de Heteroptera são perceptíveis a partir de estágios iniciais da meiose I nos machos, podendo

235 ser vistos como corpos heteropicnóticos positivos (UESHIMA, 1979). Essa heteropicnose  
236 positiva sugere que os cromossomos sexuais são heterocromáticos (BRESSA et al., 2009).

237 Grande parte dos sistemas cromossômicos descritos em Heteroptera é de  
238 sistemas simples, XX/XY (71,4%) e XX/X0 (14%), mas também são encontrados sistemas  
239 múltiplos de determinação sexual ( $X_nX_n X_nY$ ;  $X_nX_n/X_n0$  e  $XX/XY_n$ , somando 13,5%), que  
240 provavelmente são derivados de fragmentações dos cromossomos X ou Y ancestral dos  
241 sistemas simples (PAPESCHI; BRESSA, 2006).

242 Em diferentes grupos são encontradas variações com relação os sistemas de  
243 determinação sexual. O gênero *Dysdercus* (Pyrrhocoridae) possui uma grande variabilidade  
244 quanto a sua constituição cromossômica e sistemas de determinação sexual. Em seis espécies  
245 neotropicais, por exemplo, são encontrados três sistemas de determinação do sexo diferentes,  
246  $2n = 14 + X_0$  em *D. honestus* e  $2n = 12 + X_0$  em *D. chaquensis*, *D. ruficollis* e *D. imitator*;  $2n =$   
247  $14 + X_1X_20$  em *D. peruvianus* e  $2n = 10 + neoX neoY$  em *D. albofasciatus* (MOLA;  
248 PAPESCHI, 1997).

249 No gênero *Belostoma* são encontrados dois sistemas de determinação do  
250 sexo, um simples e um múltiplo, e em ambos os casos o sexo masculino é heterogamético  
251 (BARDELLA et al., 2012; CHIRINO et al., 2013; CHIRINO; BRESSA, 2014) (TABELA  
252 01). Neste gênero os bivalentes autossômicos são sinápticos e quiasmáticos e os cromossomos  
253 sexuais assinápticos e aquiasmáticos. Em metáfase II os cromossomos sexuais pareiam-se por  
254 suas extremidades formando um pseudo-bivalente ou pseudo-polivalente, a chamada  
255 conformação “Touch-and-go” (UESHIMA 1979; PAPESCHI; BRESSA 2006; BARDELLA  
256 et al. 2012), isso ocorre, pois, a atividade cinética é restrita às regiões terminais (MOTZCO;  
257 RUTHMAN, 1984).

258 Papeschi e Bressa (2006), propuseram o cariótipo ancestral dos machos para  
259 Belostomatidade como sendo  $2n = 28 = 26 + XY$ , do qual os cariótipos com sistema de  
260 determinação sexual múltiplo ( $2n = 26 + X_1X_2Y$ ) e também os cariótipos menores ( $2n =$   
261  $6 + XY$ ;  $13 + XY$ ;  $14 + XY$  e  $22 + XY$ ) teriam se originado, por fragmentação do cromossomo X  
262 ancestral ou por fusões cromossômicas, respectivamente. Estudos em diferentes espécies e  
263 populações mostraram que um cromossomo X do sistema ancestral simples (XY), foi  
264 “substituído” por dois cromossomos X um pouco menores nos indivíduos mutantes  
265 (CHIRINO et al., 2013). Por outro lado, espécies com o número cromossômico menor,

266 apresentam cromossomos maiores (PAPESCHI; BRESSA, 2006). Essa relação intraespecífica  
267 representa uma evidência direta de que a origem dos sistemas múltiplos passou por  
268 fragmentações em *Belostoma* (CHIRINO et al., 2013).

269                   A hipótese proposta por CHIRINO et al. (2013) baseada na localização das  
270 Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) e sua confirmação com a utilização de sondas de  
271 DNA ribossômico (DNAr), sugere que existem dois padrões para as espécies do gênero já  
272 estudadas: i) a RON localizada na região terminal dos dois cromossomos sexuais em espécies  
273 com sistemas simples (XY), ii) RON localizada na região terminal de um par de autossomos  
274 em sistemas múltiplos. Assim a localização dos sítios de DNAr pode estar associada às  
275 variações no sistema de determinação sexual.

276                   Essa hipótese sugere que uma fragmentação do cromossomo X único do  
277 cariótipo ancestral ( $2n = 28 = 26+XY$ ) resultou em um cariótipo derivado  $2n = 29 =$   
278  $26+X_1X_2Y$ , presente em *B. dentatum*, *B. elegans*, *B. elongatum* e *B. gestroi*, e que fusões de  
279 autossomos e fusões dos cromossomos sexuais (XY) com autossomos resultaram na redução  
280 do número diploide ( $2n = 8,16$ ) e no aumento dos cromossomos (CHIRINO et al., 2013). O  
281 citótipo argentino de *B. candidulum* descrito por Chirino e Bressa, 2014, revelou um novo  
282 número diploide para o grupo, incrementando essa hipótese e mostrando novas linhas  
283 evolutivas, de um processo que continua acontecendo (Fig. 2).

284                   Fusões e fragmentações estão entre os principais mecanismos de evolução  
285 cariotípica até agora relatados em Heteroptera (PAPESCHI; BRESSA, 2006). Os  
286 cromossomos de natureza holocinética e o comportamento aquiastmático dos cromossomos  
287 sexuais dos machos são os principais fatos que sustentam essas hipóteses (UESHIMA, 1979;  
288 MANNA, 1984; THOMAS, 1987) por suportarem melhor esses eventos, possibilitando assim  
289 uma constante variação cariotípica.

290

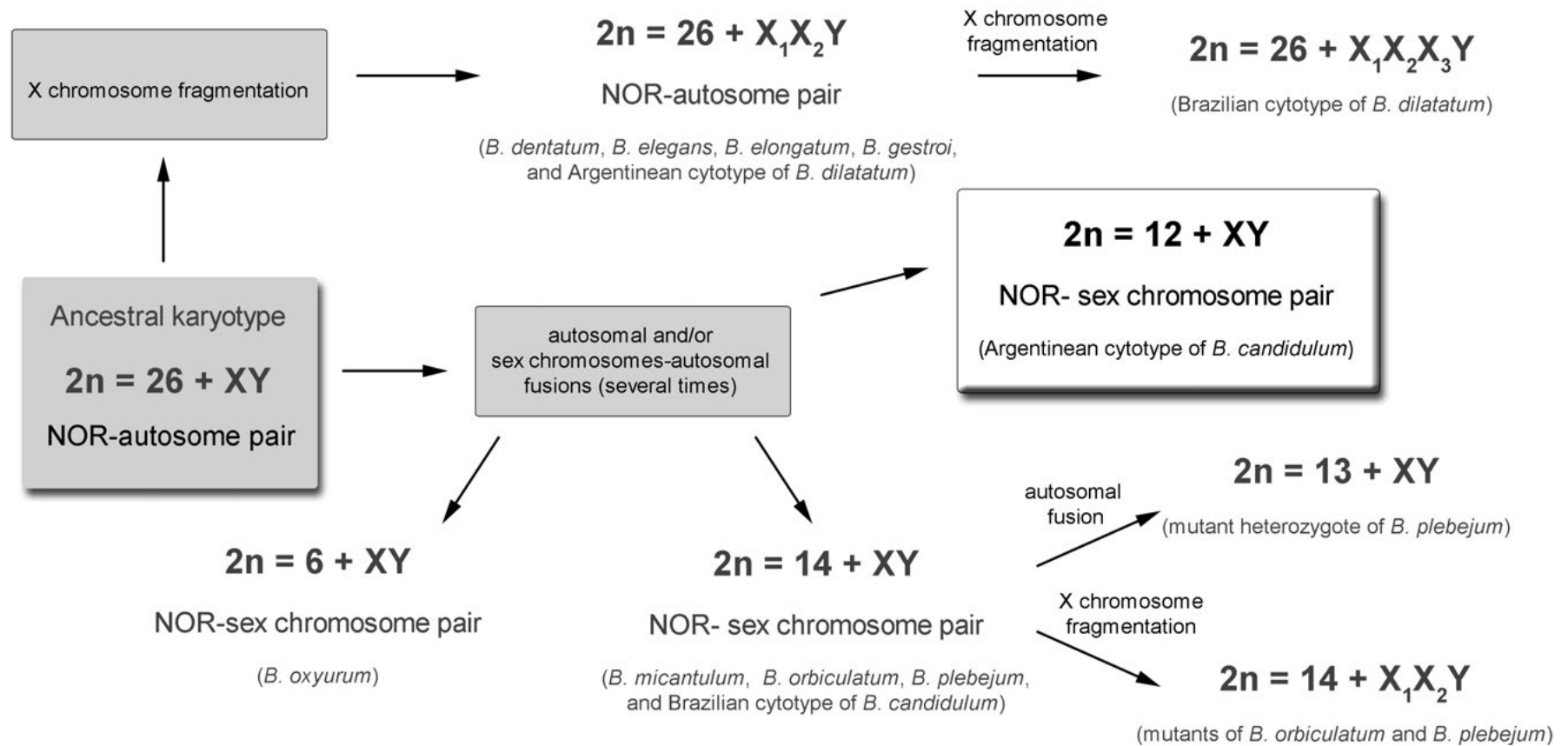


FIGURA 2 – Esquema hipotético da evolução cariotípica em espécies do gênero *Belostoma*.

FONTE: CHIRINO; BRESSA, 2014

## 292 3 OBJETIVOS

293

### 294 3.1 Objetivo Geral

295

296 Diante da grande diversidade de espécies e de sistemas de cromossomos  
297 sexuais em Belostomatidae, e também devido ao baixo número de estudos no gênero e o  
298 pouco conhecimento sobre a evolução dos cromossomos sexuais no grupo, o presente  
299 trabalho tem como objetivo geral a caracterização citogenética de diferentes espécies do  
300 gênero *Belostoma*, com o emprego de técnicas convencionais e moleculares.

301

### 302 3.2 Objetivos Específicos

303

- 304 - Caracterizar citogeneticamente espécies do gênero *Belostoma* coletadas em diferentes
- 305 regiões do Brasil;
- 306 - Isolar, amplificar e localizar o cromossomo sexual X da espécie *B. horvathi*;
- 307 - Isolar, caracterizar e localizar DNAs repetitivos pela técnica de *Cot*-1
- 308 - Isolar, caracterizar e localizar o DNA ribossômico 18S da espécie *B. horvathi*;
- 309 - Correlacionar os dados obtidos com a literatura a fim de elucidar as dúvidas quanto a
- 310 estrutura, origem e evolução cariotípica de *Belostoma*.

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

# Capítulo 1

327

328

329

Uma nova abordagem sobre a evolução cromossômica no  
gênero *Belostoma* (Heteroptera: Belostomatidae)

330

331

332

333

Artigo a ser submetido a revista *Biological Journal of the Linnean Society*

334

335

336 **Uma nova abordagem sobre a evolução cromossômica no gênero *Belostoma***  
 337 **(Heteroptera: Belostomatidae).**

338 RAQUEL BOZINI GALLO<sup>1</sup>; RACHEL COLAUTO MILANEZI AGUIAR<sup>1</sup>; LAURIVAL  
 339 VILAS-BOAS<sup>2</sup>; POLIANA ALVES SIDOL WOLF<sup>1</sup>; JOSÉ RICARDO INACIO RIBEIRO<sup>3</sup>,  
 340 ANA PAULA SCARAMAL RICCIETTO<sup>2</sup> E RENATA DA ROSA<sup>1</sup>.

341 <sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Animal - Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de  
 342 Londrina, Rod. Celso Garcia Cid/pr 445, KM 380, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

343 <sup>2</sup> Laboratório de taxonomia de bactérias/ Bioinseticida Departamento de Biologia Geral,  
 344 Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid/pr 445, KM 380, 86051-990, Londrina,  
 345 PR, Brasil.

346 <sup>3</sup>Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil.

347

348 **RESUMO**

349

350 O gênero *Belostoma*, família Belostomatidae, inclui os maiores heterópteros e seus  
 351 representantes possuem hábitos aquáticos e predatórios desempenhando papel importante  
 352 como agentes de controle biológico. Esse gênero é bastante numeroso e apresenta dúvidas  
 353 sobre sua evolução cariotípica, que envolve eventos de agmatoploidia e simplóidia  
 354 cromossômicas, bem como sistemas múltiplos e simples de determinação cromossômica do  
 355 sexo. Neste trabalho foram analisadas oito espécies do gênero *Belostoma* (*B. candidulum*, *B.*  
 356 *cummingsi*, *B. dentatum*, *B. dilatatum*, *B. elongatum*, *B. horvathi*, *B. testaceopallidum* e  
 357 *Belostoma* sp 1) de diferentes localidades do Brasil. As análises meióticas revelaram  
 358 cariótipos de  $2n = 14+XY$  para *B. horvathi*,  $2n = 22+XY$  para *B. cummingsi*,  $2n = 26+X_1X_2Y$   
 359 para *B. dentatum*, *B. elongatum* e *Belostoma* sp 1 e  $2n = 26+X_1X_2X_3Y$  para *B.*  
 360 *testacopallidum*. Todas as espécies apresentaram cromossomos holocinéticos. Foram  
 361 observadas diferenças na distribuição da heterocromatina entre as espécies bem como a  
 362 composição de bases dos blocos heterocromáticos (CMA<sub>3</sub>/DAPI). A sequência de DNAr 18S  
 363 extraída de *B. horvathi* apresentou alta similaridade com outras sequências depositadas no  
 364 NCBI, e sendo utilizada como sonda. Os *clusters* de DNAr 18S foram evidenciados tanto nos  
 365 cromossomos sexuais quanto nos autossomos, formando assim quatro padrões sendo alguns  
 366 diferentes dos existentes até o momento. A análise por C<sub>0</sub>t-1 evidenciou que a porção de DNA  
 367 repetitivo é composta em parte por um microssatélite e que este está presente nos blocos  
 368 terminais heterocromáticos DAPI<sup>+</sup> dos autossomos e totalmente ausente no cromossomo Y.  
 369 Os dados do presente trabalho e os da literatura nos levaram a propor uma nova hipótese de  
 370 evolução para o grupo, com um cariótipo ancestral com número diploide baixo, sistema  
 371 simples de determinação sexual e Região Organizadora de Nucléolo (RON) nos cromossomos  
 372 sexuais. A partir desse cariótipo teriam sido formados os demais cariótipos a partir de eventos  
 373 de agmatoploidias, simplóidias e movimentação do DNAr 18S. O cromossomo X de *B.*  
 374 *horvathi* foi microdissectado e amplificado, e utilizado como sonda para a análise de  
 375 similaridade dos cromossomos sexuais entre as espécies. A Hibridização Fluorescente *in situ*  
 376 (FISH) realizada com a sonda gerada a partir do cromossomo X, apresentou hibridização  
 377 uniforme por todo o corpo heteropicnótico positivo correspondente ao cromossomo X em  
 378 interfase quando hibridizada na espécie de origem, e quando hibridizada na espécie *B.*  
 379 *dentatum* apresentou marcações discretas, podendo ser um indício de divergências na  
 380 composição dos cromossomos X entre as espécies com diferentes sistemas de determinação

381 sexual. Os dados do presente estudo ampliam o conhecimento sobre o grupo, trazendo novas  
382 informações e uma nova hipótese de evolução cariotípica para o grupo.

383 **Palavras-chave:** citogenética; DNAr; evolução cariotípica; cromossomos sexuais

384

## 385 **INTRODUÇÃO**

386 Os representantes da família Belostomatidae são conhecidos como “baratas  
387 d’água” e estão entre os maiores heteropteros. Possuem hábitos aquáticos e predatórios e  
388 atuam principalmente como agentes de controle biológico (SAHA et al., 2010). Além da  
389 grande importância ecológica, esses animais são modelos interessantes para o estudo do  
390 comportamento meiótico dos cromossomos autossômicos e sexuais.

391 As espécies dessa família analisadas até o momento, apresentaram  
392 cromossomos holocinéticos (sem centrômero localizado) e diferentes sistemas cromossômicos  
393 de determinação sexual (BARDELLA et al., 2012; CHIRINO et al., 2013). Além disso,  
394 apresentam também um comportamento meiótico diferente entre autossomos e cromossomos  
395 sexuais (PAPESCHI; BRESSA, 2006), onde os cromossomos sexuais apresentam-se  
396 aquiasmáticos (UESHIMA, 1979) e se comportam como univalentes em meiose I, nos  
397 machos, se dividindo equacionalmente na anáfase I, e se “associando” em meiose II,  
398 formando o chamado pareamento “touch-and-go” (BARDELLA et al., 2012; PAPESCHI;  
399 BRESSA, 2006).

400 No gênero *Belostoma*, as análises citogenéticas são restritas a 17 espécies, a  
401 maioria delas apresentando apenas a descrição de número cromossômico/fórmula cariotípica  
402 (CHIRINO et al., 2013). O número diploide modal é de  $2n = 26 A+ X_1X_2Y$ , e variações  
403 cariotípicas são observadas quanto ao número de autossômicos e aos sistemas de  
404 determinação sexual, que podem ser simples ou múltiplos (PAPESCHI; BRESSA, 2006).  
405 Apenas sete espécies possuem dados sobre a localização de DNA ribossômico 18S (DNAr  
406 18S), nos quais os *clusters* foram observados tanto em cromossomos sexuais quanto em  
407 autossomos (PAPESCHI; BRESSA, 2006; CHIRINO et al., 2013). DNAs repetitivos, como  
408 DNAr, representam excelentes marcadores cromossômicos importantes na citogenética  
409 molecular, utilizados em estudos de evolução de espécies, cromossomos supranumerários e  
410 sexuais e identificação de rearranjos cromossômicos e evolução cariotípica (CABRAL-DE-  
411 MELLO et al., 2010).

412 Além do grande número de espécies do gênero *Belostoma*, sua diversidade  
413 cariotípica chama bastante a atenção para a escassez de estudos acerca da evolução  
414 cromossômica do grupo. Os diferentes sistemas de determinação sexual são um dos temas  
415 mais intrigantes dentro desse gênero, sendo assim algumas hipóteses já foram criadas para  
416 buscar responder essas perguntas. Chirino et al. (2013) uniram os dados citogenéticos de  
417 todas as espécies estudadas e sugeriram dois grupos, de acordo com a localização dos sítios  
418 de DNAr 18S, , onde a partir da fórmula cariotípica ancestral ( $2n = 26+XY$ ) um grupo sofreu  
419 agmatoploidias no cromossomo X formando as fórmulas cariotípicas com sistema múltiplo de  
420 determinação sexual ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  e  $X_1 X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y$ ), e o outro grupo sofreu  
421 sucessivas simplóidias entre cromossomos sexuais e autossomos formando cariótipos com  
422 baixo número diploide.

423 Diante da grande diversidade e importância do gênero *Belostoma*, este  
424 trabalho tem por objetivo a análise citogenética de oito espécies do gênero coletadas em  
425 diferentes locais do Brasil, a fim de compreender os mecanismos envolvidos na evolução  
426 cariotípica do grupo, principalmente aqueles relacionados aos sistemas de cromossomos  
427 sexuais.

428

## 429 MATERIAL E METODOS

430

431 Material Biológico e preparação cromossômica

432 As espécies do gênero *Belostoma* foram coletadas em diferentes localidades  
433 dos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (TABELA 01). Os indivíduos  
434 coletados foram enviados para a Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), para  
435 identificação e depositados em coleção entomológica. Os testículos foram dissecados e  
436 fixados em solução de metanol e ácido acético (3:1, v:v) e imediatamente armazenados em  
437 freezer  $-20^{\circ}$  C. Para confecção das lâminas, o material foi incubado em ácido acético 60% por  
438 aproximadamente 20 min e submetido à técnica de esmagamento. As lamínulas foram  
439 removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secaram ao ar.  
440 Posteriormente as lâminas foram coradas com Giemsa 4% para análises convencionais.

441

442 Bandamento C e Fluorocromos

443 A heterocromatina foi identificada pela técnica de obtenção de bandas-C  
444 (Sumner, 1972). Após o bandamento-C as lâminas foram coradas com fluorocromos seguindo  
445 a metodologia descrita por Schweizer (1980) e utilizando o fluoróforos Cromomicina A<sub>3</sub>  
446 (CMA<sub>3</sub>) para identificar regiões ricas em bases guanina (G) e citosina (C) e o 4'-6-diamino-  
447 2phenylindole (DAPI) para destacar as regiões cromossômicas ricas em bases adenina (A) e  
448 timina (T) em células meióticas.

449

#### 450 Microdissecção e amplificação do cromossomo X

451 Para a análise do cromossomo X, foi escolhida a espécie *Belostoma*  
452 *horvathi*, pelo fato de apresentar sistema simples de determinação do sexo (XX/XY), o que  
453 permite a identificação do cromossomo X para o seu correto isolamento. Foram coletados 10  
454 cromossomos X. Os procedimentos de microdissecção foram realizados em microscópio  
455 invertido (Olympus® IX71), equipado com microdissector mecânico (Narishige® ONE-3).  
456 As agulhas foram preparadas por capilares com pontas de aproximadamente 0,7 µm no  
457 'micropipette puller' (Narishige® PC-10). A amplificação e marcação dos cromossomos  
458 isolados por microdissecção foi realizada por meio dos kits WGA 4 (Genomeplex Single Cell  
459 Whole Genome Amplification Kit) e WGA 3 (Genomeplex Whole Genome Amplification  
460 Reamplification Kit) conforme a especificação do fabricante. O DNA amplificado foi  
461 quantificado por espectrofotometria em um NanoDrop, e sua qualidade foi analisada através  
462 de gel de agarose.

463

#### 464 Extração de DNA e caracterização de DNAr

465 O DNA utilizado para o isolamento e caracterização de DNAr 18S foi  
466 extraído do tecido muscular de um indivíduo adulto de *B. horvathi*. A extração de DNA foi  
467 realizada segundo o método de fenol/clorofórmio. O DNAr 18S foi amplificado utilizando os  
468 primers 18S Forward 5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATC-3' e Reverse 5'-  
469 GAGTCTCGTTCGTTAT CGGA-3' (WHITING et al., 2002). A Reação em Cadeia da  
470 Polimerase (PCR) foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 100 ng de DNA da  
471 amostra, 1 µL de cada primer (100mM) e 12,5 µL Go Taq® Green Master Mix (Promega). O  
472 produto da PCR foi clonado com o Kit pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector Systems  
473 (Promega), com células competentes *E. coli* linhagem TOP 10. Os clones obtidos foram  
474 sequenciados em sequenciador automático 3500xL (Applied Biosystems). A limpeza,  
475 determinação da qualidade das sequências e construção dos contigs foi realizada pelo

476 software Phred-PhrapConsed. A sequência consenso foi comparada com outras sequências  
477 depositadas no banco de dados GenBank através da ferramenta BLAST  
478 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

479

480 Isolamento de DNA alta e moderadamente repetitivo: fração de DNA  $C_{0t-1}$

481           Para o isolamento da fração enriquecida de DNA repetitivo foi realizada a  
482 técnica de cinética de desnaturação e reanelamento ( $C_{0t-1}$ ) (MARTINS, 2007). O DNA  
483 genômico foi extraído do tecido muscular de um indivíduo adulto de *Belostoma dentatum*  
484 segundo o método de fenol/clorofórmio, fragmentado em autoclave por 10 minutos,  
485 desnaturado a 95°C por 10 minutos e renaturado à 65°C por 10 minutos. O tratamento da  
486 amostra com a enzima S1 nuclease ocorreu à 37°C por 8 minutos e seu congelamento foi  
487 realizado por nitrogênio líquido. A qualidade das amostras tratadas foi analisada através de  
488 gel de agarose. Os fragmentos isolados foram clonados com o Kit pMOS Blue Blunt-Ended  
489 Cloning (Sigma Aldrich) com células competentes *E. coli* linhagem Dh10b. Os clones obtidos  
490 foram sequenciados em sequenciador automático 3500xL (Applied Biosystems). A limpeza,  
491 determinação da qualidade das sequências e construção dos contigs foi realizada pelo  
492 software Phred-PhrapConsed. A sequência consenso contida no clone *pBd\_11* foi comparada  
493 com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank através da ferramenta  
494 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

495

496 Hibridização Fluorescente *in situ*

497           A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada segundo descrito por  
498 Pinkel et al. (1986). O clone *pBh18S\_c2* contendo a sequência parcial de DNAr 18S de *B.*  
499 *horvathi*; e as sondas dos cromossomos sexuais e da porção de DNA repetitivo ( $C_{0t-1}$ ), foram  
500 marcados com digoxigenin-11dUTP por *nick translation* (Dignick translation Roche).

501           As lâminas foram tratadas com 50µL de mix de hibridação contendo 7,5µL de  
502 sonda marcada, 30 µL de formamida 50%, 12 µL de polietilenoglicol 50%, 16 µL de 20×  
503 SSC. A desnaturação dos cromossomos foi feita em formamida 70% a 70°C por 4 min em  
504 banho-maria, e a hibridização foi por realizada por aproximadamente 16 h a 37°C em câmara  
505 úmida. Para a detecção foi utilizado 1 µL de anti-digoxigenin rhodamine em 49 µL de BSA  
506 5%. Após as lavagens pós – detecção, as lâminas foram montadas com 25 µL de DABCO, 3  
507 µL de DAPI e 3 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>.

508

509 Captura e análise de imagens

510 As lâminas submetidas a coloração convencional e FISH foram analisadas  
 511 em fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 4500 B equipado com uma câmera DFC 300  
 512 FX, com software de análise de imagens Motic Images Plus 3.2. As imagens dos  
 513 cromossomos foram captadas separadamente em filtros específicos para cada tratamento.

514

515 **RESULTADOS**

516 Nas oito espécies analisadas neste trabalho foram encontradas quatro  
 517 fórmulas cariotípicas diferentes (Fig. 1): (i) *B. horvathi* com  $2n = 14+X+y$  (Fig. 1b); (ii) *B.*  
 518 *cummingsi* com  $2n = 22+X+y$  (Fig. 1f); (iii) *B. dentatum*, *B. elongatum* e *B. discretum* com  $2n$   
 519  $= 26+X_1+X_2+Y$  (Fig. 2 b, f, j); e (iv) *B. testacopallidum* com  $2n = 26+x_1+x_2+x_3+Y$  (Fig. 3b).  
 520 Os dados das análises convencionais para as espécies *B. candidulum* e *B. dilatatum* já foram  
 521 publicados por Bardella et al. (2012), apresentando  $2n=14+X+y$  (Fig. 1j) e  $2n = 26+$   
 522  $x_1+x_2+x_3+Y$  (Fig. 3f), respectivamente. Todas as espécies possuem cromossomos  
 523 holocinéticos e sistema cromossômico de determinação sexual, com os autossomos bivalentes  
 524 dispostos em anel em metáfase I e os cromossomos sexuais univalentes no interior do anel  
 525 (Fig. 1, 2 e 3). Em diplóteno/diacinese todas as espécies apresentaram um ou dois quiasmas  
 526 por bivalente e cromossomos sexuais aquiasmáticos, as espécies *B. dentatum*, *B. elongatum*;  
 527 *B. discretum* (Fig. 2 a, e, i), e *B. testaceopallidum* (Fig. 3a) com predominância de um  
 528 quiasma por bivalente e as espécies *B. horvathi* (Fig. 1a), *B. cummingsi* (Fig. 1e), *B.*  
 529 *candidulum* (Fig. 1i) e *B. dilatatum* (Fig. 3e) com predominância de dois quiasmas por  
 530 bivalente.

531 De maneira geral, em metáfase I os autossomos se apresentaram com  
 532 tamanho semelhante e os cromossomos sexuais geralmente foram compostos por um  
 533 cromossomo X um pouco maior que o cromossomo Y., entretanto, nos casos de sistema de  
 534 determinação sexual múltiplo, os cromossomos Xs são um pouco menores. Esse padrão se  
 535 repete em todas as espécies, exceto em *B. discretum*, onde foi encontrado um par de  
 536 autossomos com tamanho muito reduzido (Fig. 2 i, j), nunca antes observado.

537 As espécies *B. horvathi* e *B. cummingsi* apresentaram pouca  
 538 heterocromatina detectada pelo bandeamento-C (Fig. 1 d, h), já as espécies *B. dentatum* (Fig.  
 539 2d) e *B. testaceopallidum* (Fig. 3d) apresentaram blocos heterocromáticos terminais na  
 540 maioria dos cromossomos e alguns blocos intersticiais.

541 A análise dos fluorocromos base-específicos revelou dois padrões distintos  
 542 para as espécies com sistemas simples: (i) *B. horvathi* (Fig. 1 c, d) e *B. candidulum* (Fig. 1 k,  
 543 l) apresentaram um bloco CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> nos cromossomos sexuais, sendo que os autossomos  
 544 apresentaram-se totalmente neutros para ambos os fluoróforos; (ii) em *B. cummingsi* (Fig. 1 g,  
 545 h) quase todo o cromossomo X apresentou-se CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>, além disso foi observado em  
 546 um bivalente autossômico blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, sendo que nesse autossomo os blocos  
 547 apresentaram um heteromorfismo de tamanho (Fig.1g). Para as espécies com sistemas  
 548 múltiplos *B. dentatum* (Fig. 2 c, d), *B. testaceopallidum* (Fig. 3 c, d), *B. dilatatum* (Fig. 3 g, h)  
 549 e *B. elongatum* (Fig.2 g, h), foi observado um bivalente autossômico com blocos  
 550 CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, além disso uma grande quantidade de blocos CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>+</sup> nos demais  
 551 autossomos. Ainda os cromossomos Xs apresentarem-se totalmente CMA<sub>3</sub><sup>0</sup>/DAPI<sup>+</sup> enquanto  
 552 que o cromossomo Y não apresentou nenhum tipo de marcação pelos dois fluorocromos.

553 A hibridização in situ utilizando como sonda a fração enriquecida de DNA  
 554 repetitivo (isolada pela técnica de C<sub>0</sub>t-1) tanto nas espécies com sistema simples quanto nas  
 555 espécies com sistema múltiplo, revelou DNAs repetitivos coincidentes com as regiões  
 556 heterocromáticas DAPI<sup>+</sup>. Além disso, os cromossomos X apresentaram-se totalmente  
 557 hibridizados com DNAs repetitivos, enquanto que o cromossomo Y não apresentou blocos  
 558 hibridizados (Fig. 3 i, j). A clonagem e sequenciamento revelou que o fragmento de 379 pb  
 559 contido no clone p*Bd*\_11, apresentou 108 pb com 100% de similaridade à um microssatélite  
 560 rico em GT descrito para *Salmo salar* (número de acesso: Y11447.1) depositado no GenBank  
 561 (NCBI) (Apêndice 1).

562 O fragmento de DNAr 18S inserido no clone p*Bh*18S\_c2 obtido do genoma  
 563 de *B. horvathi* foi clonado, sequenciado e depositado no GenBank (NCBI) (número de acesso:  
 564 KU726737), sua sequência consenso apresentou um comprimento de 1.037 pb (Apêndice 2),  
 565 com 999 pb altamente semelhantes (95%) com a região de 18S de *B. flumineum* (número de  
 566 acesso: AY252132.1) depositado no GenBank (NCBI). As FISHs com sonda de DNAr 18S  
 567 mostraram diferenças de marcações nas oito espécies estudadas. De acordo com a localização  
 568 do DNAr 18S foi possível dividir as espécies em quatro grupos: (1) *B. horvathi* e *B.*  
 569 *candidulum*, com sistema de determinação sexual simples apresentaram *clusters* de DNAr  
 570 18S nos cromossomos sexuais (Fig. 4 a,b); (2) a espécie *B. cummingsi*, também com sistema  
 571 simples, apresentou uma marcação em um cromossomo sexual e outra em um autossomo  
 572 bivalente, onde foi possível observar um heteromorfismo de tamanho (Fig. 4 c); (3) espécies  
 573 com sistema de determinação sexual múltiplo (*B. dentatum*, *B. testaceopallidum*, *B. dilatatum*  
 574 e *B. elongatum*) que apresentaram um *cluster* terminal em um par de autossomos (Fig. 4 d, e,

575 f); e (4) *B. discretum*, que apresentou sistema múltiplo de determinação sexual ( $X_1X_2Y$ ) e um  
 576 bloco de DNAr 18S em dois cromossomos sexuais, possivelmente um dos cromossomos X e  
 577 o cromossomo Y (Fig. 4g). A espécie *B. elongatum* apresentou um evidente heteromorfismo  
 578 de tamanho nos blocos de DNA r 18S, o que pode ser visto em diferentes fases (Fig. 4h).

579 O cromossomo X microdissectado da espécie *B. horvathi*, foi amplificado e  
 580 utilizado como sonda na hibridização *in situ* na própria espécie de origem, para a confirmação  
 581 da correta microdissecção, e para análise de vestígios comuns com outros cromossomos, e em  
 582 outras espécies para comparação da similaridade dos cromossomos X dos diferentes sistemas.  
 583 A FISH realizada na espécie *B. horvathi*, a espécie de origem da sonda, apresentou em  
 584 paquíteno inicial, marcação contínua e homogênea por todo o bloco heteropicnótico  
 585 correspondente ao cromossomo X, e pequenas marcações discretas em outros cromossomos  
 586 (Fig. 5 a, b). Quando hibridizada em paquíteno inicial de uma espécie com sistema múltiplo  
 587 de determinação sexual, *B. dentatum*, a sonda apresentou marcações discretas por alguns  
 588 bivalentes (Fig. 5 c, d).

589

## 590 **DISCUSSÃO**

591

### 592 *Variações nas fórmulas cariotípicas*

593 As análises de células com coloração convencional mostraram fórmula  
 594 cariotípica de  $2n = 14+X+y$  para *B. horvathi*,  $2n = 22+X+y$  para *B. cummingsi*,  $2n =$   
 595  $26+x_1+x_2+Y$  para *B. dentatum*, *B. elongatum* e *B. discretum* e  $2n = 26+x_1+x_2+x_3+Y$  para *B.*  
 596 *testacopallidum*. Todas as fórmulas cariotípicas encontradas estão de acordo com a literatura  
 597 que traz um intervalo de ocorrência dentro da família Belostomatidae de  $2n = 4$  em  
 598 *Lethocerus* sp. (CHICKERING, 1927, 1932) a  $2n = 30$  em espécies do gênero *Belostoma*  
 599 (BARDELLA et al., 2012). As espécies *B. dentatum*, *B. discretum* e *B. elongatum*  
 600 apresentaram fórmulas cariotípicas iguais às anteriormente publicadas (CHIRINO et al 2013;  
 601 PAPESCHI; BIDAU 1985; PAPESCHI, 1991; 1992; PAPESCHI; BRESSA 2006). Para a  
 602 espécie *B. cummingsi* a fórmula cariotípica  $2n = 22+X+y$ , descrita neste trabalho, mostra um  
 603 citótipo diferente do resultado encontrado por Papeschi e Bidau (1985) de  $2n = 26+x_1+x_2+Y$ .  
 604 Essa divergência pode estar relacionada a eventos de alterações cromossômicas ocorridas  
 605 entre as populações, ou representar um erro de identificação, já que as espécies são muito  
 606 semelhantes e de difícil identificação. Já para as espécies *B. horvathi*, *B. discretum* e *B.*  
 607 *testacopallidum* esses são dados inéditos, e as fórmulas cariotípicas encontradas já haviam  
 608 sido anteriormente descritas para outras espécies do gênero (Tabela 1).

609 O cariótipo ancestral proposto para o gênero *Belostoma* é  $2n = 26 + XY$ , e  
 610 devido a diversos eventos de simplóidias e agmatoploidias teriam surgido os demais  
 611 cariótipos do grupo (BARDELLA et al., 2012; CHIRINO; BRESSA, 2014; CHIRINO et al,  
 612 2013 PAPESCHI; BRESSA, 2006). O número diploide de *B. discretum*, *B. dentatum* e *B.*  
 613 *elongatum* ( $26 + X_1X_2Y$ ) teria surgido por um evento de agmatoploidia ocorrido no  
 614 cromossomo X ancestral, e é um número diploide bastante comum para o grupo, como  
 615 descrito anteriormente para *B. gestroi* (PAPESCHI; BRESSA, 2006; CHIRINO et al, 2013),  
 616 entre outros. Um segundo evento de agmatoploidia teria dado origem então ao cariótipo da  
 617 espécie *B. testaceopallidum* ( $26 + X_1X_2X_3Y$ ), assim como na espécie *B. dilatatum*  
 618 (BARDELLA et al., 2012). Já no caso de *B. cummingsi* ( $22 + XY$ ) e *B. horvathi* ( $14 + XY$ ),  
 619 simplóidias podem ter dado origem a seus cariótipos, da mesma forma que em *B. candidulum*  
 620 (BARDELLA et al., 2012), *B. micantulum* (PAPESCHI; BRESSA, 2006) e *B. orbiculatum*  
 621 (CHIRINO; BRESSA, 2011). Dessa forma, a ocorrência de agmatoploidias e simplóidias teria  
 622 sido o principal evento relacionado à evolução do gênero.

623 Como em todos os heterópteros descritos até o momento, as espécies  
 624 estudadas também apresentaram cromossomos holocinéticos (UESHIMA, 1979; JACOBS,  
 625 2004; BARDELLA et al, 2013). A presença desse tipo de cromossomo pode ser o principal  
 626 fator que influencia na grande variedade cromossômica dentro do grupo, já que cromossomos  
 627 com a atividade cinética dispersa não possuem todas as limitações adaptativas a quebras e  
 628 fusões impostas por um centrômero localizado. Essa natureza holocinética permite então que  
 629 simplóidias e agmatoploidias sejam os principais mecanismos de evolução cariotípica para os  
 630 heterópteros, já que fragmentos acêntricos e dicêntricos, por exemplo, são meioticamente  
 631 instáveis nos sistemas com centrômero localizado (PAPESCHI; BRESSA, 2006).

632 Quando cromossomos holocinéticos sofrem eventos de agmatoploidias, os  
 633 fragmentos resultantes passam a funcionar como cromossomos independentes, esse  
 634 mecanismo de variação cromossômica tem sido observado em diferentes gêneros (GUERRA,  
 635 1988) e pode ser considerado um evento comum e bastante recorrente. Dessa forma, esses  
 636 eventos podem ser mais comuns no grupo do que as simplóidias.

637 Segundo Papeschi e Bressa (2006), uma das características marcantes do  
 638 grupo Heteroptera é a alta frequência da ocorrência de um quiasma por bivalente. As espécies  
 639 *B. discretum*, *B. dentatum*, *B. elongatum* e *B. testaceopallidum* se encaixaram nessa premissa,  
 640 já as espécies, *B. cummingsi*, e *B. horvathi* apresentaram maior frequência de dois quiasmas  
 641 por bivalente. Quando autossomos bivalentes possuem um quiasma terminal, se orientam com  
 642 seus eixos longos paralelamente ao eixo metafásico, em metáfase I, assim segregam

643 reducionalmente na metáfase I e equacionalmente na metáfase II. Por outro lado, os  
644 autossomos bivalentes que possuem dois quiasmas terminais podem se comportar de duas  
645 maneiras: a) um quiasma se libera primeiro e uma posição axial é alcançada; ou b) sítios  
646 alternativos de atividade cinética são ativados e a atividade telocinética não é observada  
647 (MOLA; PAPESCHI, 1993; PAPESCHI; BRESSA, 2006; PAPESCHI et al, 2003). Os  
648 cromossomos com dois quiasmas se encontram em formato de anel, e tem maior dificuldade  
649 de ligação das fibras do fuso, portanto a quantidade de quiasmas pode influenciar na  
650 segregação dos autossomos (PAPESCHI et al., 2003). Como a presença de dois quiasmas no  
651 bivalente pode levar à ativação de sítios alternativos de ligação das fibras do fuso, e pelo fato  
652 de normalmente os cromossomos possuírem sítios frágeis mais propensos a quebras  
653 (KASAHARA, 2009), essas fibras poderiam se associar a esses sítios frágeis das cromátides,  
654 o que favoreceria a ocorrência de quebras cromossômicas. O fato de as espécies *B. cummingsi*  
655 e *B. horvathi* possuírem baixo número cromossômico e, com maior frequência, dois quiasmas  
656 por bivalente, reforça a proposição de que o cariótipo ancestral tenha baixo número diploide e  
657 tenha sofrido sucessivos eventos de agmatoploidia.

658 Levando em consideração que a ocorrência de agmatoploidias é mais  
659 favorável do que a ocorrência de simploidias e que as espécies com número diploide menor  
660 apresentaram dois quiasmas, pode-se sugerir que o principal evento relacionado à variação no  
661 número diploide em Belostomatidae são as agmatoploidias, desta forma, números diploides  
662 baixos seriam considerados basais aos demais. Ainda assim, simploidias são eventos  
663 importantes para o surgimento de alguns cariótipos, entretanto as agmatoploidias  
664 provavelmente são alterações cromossômicas mais comuns para o grupo.

665

#### 666 *HETERO Cromatina, MICROSSATÉLITE E DNAr 18S*

667 Estudos recentes com a localização de heterocromatina mostram que  
668 Heteroptera possui blocos principalmente nas regiões terminais, mas também possui bandas  
669 intersticiais (ITUART; PAPESCHI, 2004), assim como encontrado em todas as espécies deste  
670 trabalho. De acordo com o proposto por Papeschi e Bressa, (2006), a comparação entre  
671 conteúdo de DNA e heterocromatina mostra que a quantidade de heterocromatina muda  
672 durante a evolução, e espécies com número cromossômico reduzido são caracterizadas por  
673 também possuírem menor conteúdo de DNA, possivelmente devido à escassez de  
674 heterocromatina. As espécies deste trabalho corroboram o proposto acima, onde, as com  
675 menor número cromossômico *B. horvathi*, *B. cummingsi*, possuem menor quantidade de

676 heterocromatina detectada no bandejamento se comparadas às espécies com maior número  
677 cromossômico, *B. dentatum*, e *B. testaceopallidum*.

678 A heterocromatina além de excelente marcador citogenético é conhecida por  
679 possuir diversos efeitos genéticos, sua presença pode promover uma estável epigenética,  
680 podendo silenciar genes inseridos ou próximos às regiões heterocromáticas (SHIN et al.,  
681 2005), podendo por exemplo atuar diretamente no controle de funções genéticas vitais e no  
682 pareamento de cromossomos sexuais (PEACOCK, et al., 1978). Perdas significativas de  
683 regiões heterocromáticas podem acarretar sérios danos ao organismo, sendo assim, processos  
684 evolutivos envolvendo perda de heterocromatina, podem não ser favoráveis, tornando os  
685 processos de heterocromatinização mais viáveis evolutivamente e mais prováveis de  
686 acontecer que a perda da mesma.

687 Os resultados do presente estudo, somados aos que já existem na literatura,  
688 nos permitem dizer que mecanismos de heterocromatinização estejam envolvidos na evolução  
689 do grupo, o que também ocorre em outros grupos de insetos como Orthoptera, indicando que  
690 os DNAs repetitivos possuem uma grande importância nas alterações citogenéticas que  
691 ocorrem nele (ROCHA et al, 2015). Se considerarmos os eventos de heterocromatinização,  
692 nossos resultados são contrários ao proposto por Chirino et al, (2013), uma vez que dessa  
693 forma espécies com o número diploide maior não poderiam ser ancestrais, mas sim aquelas  
694 com número diploide menor e menos heterocromatina em seus cromossomos

695 As análises por fluorocromos evidenciaram dois grupos com relação a  
696 distribuição da heterocromatina. Geralmente, em Heteroptera, blocos ricos em GC estão  
697 associados a sítios de DNAr, como descrito para *Triatoma matogrossensis* (BARDELLA et  
698 al, 2010) e para *Camptischium clavipes* (Coreidae) (CATTANI et al, 2004). Uma observação  
699 pode ser feita com relação às espécies com grande quantidade de heterocromatina, onde essa  
700 heterocromatina apresentou-se, em sua maioria, DAPI<sup>+</sup>. A análise do DNA repetitivo com a  
701 sonda de microssatélite evidenciou que este distribui-se principalmente nessas regiões ricas  
702 em AT mesmo nas espécies com baixa quantidade de heterocromatina, esse microssatélite  
703 também pode ser evidenciado, porém em menor quantidade. Além disso, essa sequência não  
704 foi observada no cromossomo Y, em nenhum tipo de sistema sexual. Esses dados confirmam  
705 que processos de heterocromatinização (spreading) estão ocorrendo no gênero, e que o  
706 acúmulo de sequências repetitivas nos cromossomos está diferenciando os cariótipos das  
707 espécies, e que isso é parte importante da evolução do grupo.

708 As hibridizações com sonda de DNAr 18S revelaram também a formação de  
709 quatro grupos quanto a localização dessa sequência: (1) espécies com sistema sexual simples

710 e DNAr 18S nos cromossomos sexuais; (2) espécie com sistema simples e uma marcação em  
711 um cromossomo sexual e outra em um autossomo bivalente; (3) espécies com sistema  
712 múltiplo e DNAr terminal em um par de autossomos; e (4) espécie com sistema múltiplo e um  
713 bloco de DNAr 18S em dois cromossomos sexuais, provavelmente correspondentes a um  
714 cromossomo X e ao Y. No caso do grupos 1 e 3 os dados são congruentes com os relatados  
715 para diferentes espécies do gênero, entretanto para os grupos 2 e 4 esses dados são diferentes  
716 dos descritos até o momento (CHIRINO; BRESSA, 2014; CHIRINO et al, 2013) onde o  
717 DNAr 18S encontra-se exclusivamente em cromossomos sexuais nos sistemas simples, e em  
718 cromossomos autossômicos em sistemas múltiplos. Isso demonstra que algumas espécies  
719 estudadas neste trabalho podem estar sofrendo a ação de eventos genéticos, como a  
720 transposição gênica ou translocações entre cromossomos sexuais e autossômicos, levando à  
721 alteração na posição da sequência de DNAr 18S. Esse fato pode ser favorecido por sua usual  
722 localização distal, já que essa é uma região cromossômica mais dinâmica e facilita assim a  
723 dispersão do segmento pelo genoma (SCHWEIZER; LOIDL, 1987; CABRAL-DE-MELLO  
724 et al, 2011). Esse reposicionamento é bem documentado para coleópteros como os do gênero  
725 *Cicindela*, onde ocorreram translocações entre autossomos e cromossomos sexuais, sendo  
726 assim, a presença de DNAr nos cromossomos sexuais pode então ser explicada pela  
727 transposição de *clusters* e não somente por rearranjos cromossomais como fusões. (GALIÁN  
728 et al, 2007).

729           Em *B. elongatum* os blocos de DNAr apresentaram heteromorfismo de  
730 tamanho que também pode ser evidenciado na coloração com CMA<sub>3</sub>, essa diferença pode  
731 acontecer por variações no número de cópias do gene de RNAr, como já descrito para  
732 diversos organismos, como *Holhymenia rubiginosa* (BRESSA et al, 2008), *Tritoma*  
733 *rubrovaria*, e outros (BARDELLA et al., 2010). Bardella et al (2013), sugere associação com  
734 mecanismos de amplificação (duplicação) ou crossing-over desigual. Outra observação  
735 importante foi a diferença entre os exemplares de *B. candidulum* estudados aqui e outra  
736 população da mesma espécie. Chirino e Bressa (2014), analisaram uma população argentina  
737 da espécie *B. candidulum*, que apresentou número diploide  $2n = 12+XY$  com um autossomo  
738 muito maior que os outros, diferente da população brasileira que possui  $2n = 14+XY$   
739 (BARDELLA et al, 2012). Como relatado por Bardella et al (2012) e Papeschi (1992) as  
740 populações argentina e brasileira de *B. dilatatum* também apresentaram fórmulas cariotípicas  
741 com sistemas de determinação sexual diferentes, com  $2n = 26+X_1X_2Y$  e  $2n = 26+X_1X_2X_3Y$ ,  
742 respectivamente. Os dados do presente trabalho são o primeiro relato da localização de DNAr  
743 para a espécie e revelaram sua localização subterminal em um bivalente autossomo.

744

745 *EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM BELOSTOMA*

746

747

748

749

750

751

752

753

754

Em vista da grande diversidade cariotípica do gênero *Belostoma*, Chirino et al (2013), uniram todos os dados disponíveis para o grupo e formularam uma hipótese de evolução. Nessa hipótese, um cariótipo ancestral de  $2n = 26+XY$  com NORs em um par de autossomos, teria dado origem aos demais cariótipos do grupo por meio de sucessivos eventos de simplloidias e agmatoploidias. Para a formulação de tal hipótese, foi analisada a localização dos genes de DNAr 18s onde dois padrões de distribuição puderam ser observados. No primeiro esta sequência está localizada nos cromossomos sexuais, onde as espécies possuem sistema simples de determinação sexual, e no outro, o DNAr 18S está em um par de autossomos, onde as espécies possuem sistema múltiplo de determinação sexual.

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

De acordo com essa hipótese, os cariótipos do primeiro grupo seriam formados a partir de sucessivas simplloidias entre autossomos e cromossomos sexuais do cariótipo ancestral, o que acarretou na diminuição do número cromossômico, aumento de tamanho dos cromossomos e a realocação do sítio de DNAr para os cromossomos sexuais. Além disso, nota-se nessas espécies uma escassez de heterocromatina, segundo Chirino e Bressa (2014), o cariótipo ancestral possuía baixa quantidade de heterocromatina, característica mantida nos cariótipos com número cromossômico reduzido. O segundo grupo engloba as espécies que tiveram seus cariótipos formados a partir de uma ou duas fragmentações do cromossomo X ancestral, formando  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  dos novos cariótipos, estes são menores que o cromossomo ancestral (PAPESCHI, 1996).

765

766

767

768

769

No presente estudo, duas espécies analisadas não se encaixam em nenhum dos grupos propostos acima. A primeira, *B. discretum* possui  $2n = 26+x_1+x_2+Y$  com *clusters* terminais de DNAr em dois cromossomos sexuais; e a segunda espécie é *B. cummingsi* que apresentou  $2n = 22+x+Y$ , com dois blocos terminais de DNAr 18S em um cromossomo sexual e um bloco terminal em um bivalente.

770

771

772

773

774

775

776

777

Considerando os dados da literatura e os obtidos nesse trabalho, uma nova proposta de evolução para o gênero *Belostoma* pode ser sugerida com base nos caracteres citológicos. Se levarmos em conta que os processos de agmatoploidia são mais fáceis de acontecer que os de simplloidias, e que mecanismos de heterocromatinização são mais comuns que perdas de heterocromatina, podemos propor que um ancestral com número diploide baixo, sistema sexual simples, NOR nos cromossomos sexuais e pouca heterocromatina teria dado origem aos cariótipos existentes por diferentes eventos (Fig. 6). Os cariótipos com  $2n=14+XY$  teriam sofrido simplloidias nos cromossomos autossômicos (Evento A) enquanto

778 que os demais cariótipos teriam sofrido agmatoploidias (Evento B). A movimentação do  
779 DNAr 18S (translocação e/ou transposição) teria sido o evento que formou o cariótipo  
780 observado em *B. cummingsi* (Evento C). Eventos de heterocromatinização teriam formados os  
781 demais cariótipos (Evento D) que posteriormente teriam sofrido agmatoploidias em  
782 cromossomos autossômicos e sexuais (Evento E), dando origem aos cariótipos  $2n=26A+XnY$   
783 (NOR nos cromossomos sexuais), enquanto que um segundo evento de movimentação do  
784 DNAr 18S (Evento F) teria resultado na formação dos cariótipos  $2n=26A+XnY$  com a NOR  
785 nos autossomos (Fig. 6).

786                   A diversidade cromossômica observada no gênero, bem como a grande  
787 variação com relação aos cromossomos sexuais pode ser confirmada com a pintura  
788 cromossômica do cromossomo X na espécie com sistema sexual simples. A sonda obtida a  
789 partir do cromossomo X de *B. horvathi*, quando hibridizada na própria espécie, apresentou  
790 marcação homogênea no bloco heteropicnótico correspondente ao cromossomo X nas células  
791 em interfase, confirmando assim o correto isolamento do cromossomo. Quando hibridizada  
792 nas células de *B. dentatum* a sonda do cromossomo X não apresentou marcações evidentes em  
793 cromossomos sexuais, apenas marcações discretas pelos bivalentes, semelhante ao descrito  
794 em cromossomos W para lepidópteros da família Pyralidae (VÍTKOVÁ et al., 2007). Essa  
795 falta de homologia entre os cromossomos X pode ser reflexo de sua evolução, já que o  
796 cromossomo microdissectado vem de uma espécie com sistema simples de determinação  
797 sexual. Sistemas múltiplos de determinação sexual, em geral, tem origem de um sistema  
798 simples, onde ocorrem fissões cromossômicas formando os novos cromossomos do sistema  
799 (CHIRINO; BRESSA, 2014) e esse processo evolutivo pode ter causado modificações nos  
800 cromossomos sexuais, justificando assim a falta de similaridade entre eles.

801                   A análise integrada de diferentes ferramentas citogenéticas utilizadas nesse  
802 trabalho, demonstra que o gênero *Belostoma* apresenta uma grande plasticidade cariotípica.  
803 Eventos relacionados a agmatoploidias e simploidias foram fundamentais para a evolução do  
804 gênero, entretanto, outros tipos de alterações cromossômicas, como transposições de sítios de  
805 DNAr 18S e crossing-over desigual, bem como processos de heterocromatinização foram  
806 fundamentais para a sua modificação. Nossos dados dão base à uma nova proposta de  
807 evolução cariotípica trazendo a luz novas evidências de que esse grupo está em constante  
808 processo evolutivo.

809

810

811

812 **REFERÊNCIAS**

813

814 BARDELLA, V. B.; DIAS, A. L.; GIULIANO, L. C.; RIBEIRO, J. R. I.; DA ROSA, R. Sex  
815 chromosome differentiation in *Belostoma* (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae). **Genetics  
816 and Molecular Research**. v. 11, n. 3, 2012.

817

818 BARDELLA, V. B.; FERNANDES, T.; VANZELA, A. L. L. The conservation of number  
819 and location os 18s sites indicates the relative stability of rDNA in species of *Pentatomorpha*  
820 (Heteroptera). **Genome**. 18 p, 2013.

821

822 BARDELLA, V. B.; GAETA, M. L.; VANZELA, A. L. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T.  
823 V. Chromosomal location of heterochromatin and 45s rDNA sites in four South American  
824 triatomines (Heteroptera: Reduviidae). **Comparative Cytogenetics**. v. 4, nº 2, p. 141-149,  
825 2010.

826

827 BRESSA, M. J.; FRANCO, M. J.; TOSCANI, M. A.; PAPESCHI, A.G. Heterochromatin  
828 heteromorphism in *Holhymenia rubiginosa* (Heteroptera: Coreidae). **Europe Journal of  
829 Entomology**. v. 105, p. 65–72, 2008.

830 CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of  
831 repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an  
832 association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity  
833 between the B chromosome and A complement. **Heredity**. v. 104, p. 393–400, 2010.

834

835 CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of  
836 RNAs and Histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabeidae,  
837 Scarabeinae) beetles. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 134, p. 127-135, 2011.

838

839 CATTANI, M. V.; GREIZERSTEIN, E. J.; PAPESCHI, A. G. Male meiotic behaviour and  
840 nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera)  
841 analyzed by fluorescent banding and in situ hybridization. **Caryologia**. v. 57, nº 3, p. 267-  
842 273. 2004.

843

844 CHICKERING, A. M. An unusual complex in *Lethocerus*. **Anat. Rec.** v. 37, p. 156, 1927.

845

846 CHICKERING, A. M. Spermatogenesis in the Belostomatidae. III. The chromosomes in the  
847 male germ cells of a *Lethocerus* from New Orleans, Louisiana. **Pap. Mich. Acad. Sci.** v. 15,  
848 p. 357-360, 1932.

849

850 CHIRINO, M. G.; BRESSA, M. J. Caracterización de la heterocromatina en tres especies del  
851 género *Belostoma* (Hemiptera: Belostomatidae). In III Simposio Latinoamericano de

- 852 Citogenética y Evolución, XL Congreso Argentino de Genética, I Jornadas SAGNEA.  
853 Corrientes, Argentina, December 1-3, 2011.
- 854
- 855 CHIRINO, M. G.; PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. The significance of cytogenetics for  
856 the study of karyotype evolution and taxonomy of water bugs (Heteroptera, Belostomatidae)  
857 native to Argentina. **Comparative cytogenetics**. v.7, n. 2, p. 9 – 27, 2013.
- 858
- 859 CHIRINO, M. G; BRESSA, M. J. Karyotype evolution in progress: A new diploide number  
860 in *Belostoma candidulum* (Heteroptera: Belostomatidae) from Argentina a leading to new  
861 insights into its ecology and evolution. **European Journal of Entomology**. v. 111, nº 2, p.  
862 165-174. 2014.
- 863
- 864 GALIÁN, J.; PROENCA, S. J.; VOGLER, A. P. Evolutionary dynamics of autosomal-  
865 heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles  
866 (Cicindelidae). **BMC Evol Biol** v. 7 p. 158, 2007.
- 867 GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p.  
868 154, 1988.
- 869
- 870 ITUARTE, S.; PAPESCHI, A. G. Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia (Fuscagobia)*  
871 *fuscata* (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). **Genetica**. v. 122, p. 199-206, 2004.
- 872
- 873 JACOBS, D. H. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome-sex  
874 chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarinus* Jacobs (Heteroptera: Aradidae:  
875 Carventinae). **Chromosome research**, v.12, p. 175-191, 2004.
- 876
- 877 KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. 1 Ed. Ribeirão  
878 Preto, SP. Sociedade Brasileira de Genética, 160 p. 2009.
- 879
- 880 MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish  
881 genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B.G. (org). **Fish**  
882 **Cytogenetics**. 1 Ed. New Hampshire, USA: Science Publisher, 421 – 453, 2007.
- 883
- 884 MOLA, L.M.; PAPESCHI, A. G. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae,  
885 Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalent and B chromosomes.  
886 **Heredity**. v. 71, p. 33-40, 1993.
- 887
- 888 PAPESCHI, A. G. C-banding and DNA content in three species of *Belostoma* (Heteroptera)  
889 with large differences in chromosome size and number. **Genetica**. v. 76, n. 1, p. 43-51, 1988.
- 890

- 891 PAPESCHI, A. G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes  
892 of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). **Cytologia**. v. 60, n° 3, p. 291–295,  
893 1995.  
894
- 895 PAPESCHI, A. G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma*  
896 (Heteroptera, Belostomatidae). **Hereditas**. v. 115, p. 109-114, 1991.  
897
- 898 PAPESCHI, A. G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma*  
899 (Heteroptera, Belostomatidae). **Hereditas**. v. 115, p. 109-114, 1991.  
900
- 901 PAPESCHI, A. G. **Estudios citogenéticos y evolutivos em Heteroptera**. 1992. Tese  
902 (Doutorado) Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. 1992.  
903
- 904 PAPESCHI, A. G. Sex chromosome polymorphism in a species of *Belostoma*  
905 (Belostomatidae, Heteroptera). **Hereditas**. v. 124, n. 3, p. 269-274, 1996.  
906
- 907 PAPESCHI, A. G.; BIDAU, C. J. Chromosome complement and male meiosis in four species  
908 of *Belostoma* Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). *Brazilian Journal of Genetics*. v. 8, n°  
909 2, p. 249–261, 1985.  
910
- 911 PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of**  
912 **Biological Research**. v. 5, p. 3-21, 2006.  
913
- 914 PAPESCHI, A. G.; MOLA, L. M.; BRESSA, M. J.; GREIZERSTEIN, E. J.; LIA, V.;  
915 POGGIO, L. Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: alternative sites of spindle  
916 attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). **Chromosome research**.  
917 v. 11, p. 725-733, 2003.  
918
- 919 PEACOCK, W. J.; LOHE, A. R.; GERLACH, W. L.; DUNSMUIR, P.; DENNIS, E. S;  
920 APPLES, R. Fine Structure and Evolution of DNA in Heterochromatin. Cold Spring Harbor  
921 Laboratory Press. v. 42, p. 1121, 1978.  
922
- 923 PINKEL, D; STRAUME, T; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-  
924 sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.  
925 v.83, p.2934-2938, 1986.  
926
- 927 ROCHA, M. F.; PINE, M. B.; OLIVEIRA, E. F. A. S.; LORETO, V. GALLO, R. B.; SILVA,  
928 DA ROSA, R. Spreading of heterochromatin and karyotype differentiation in two Tropicidacris  
929 Scudder, 1869 species (Orthoptera, Romaleidae). **Comparative cytogenetics**. v. 44, n. 3, p.  
930 435, 2015.  
931
- 932 SAHA, N.; ADITYA, G.; SAHA, G. K.; HAMPTON, S. E. Opportunistic foraging by  
933 heteropteran mosquito predators. **Aquatic Ecology**. v. 44, p. 167-176, 2010.

934

935 SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C  
936 banded patterns. **Chromosome Today**. v. 9, p. 61–74, 1987.

937

938 SHIN, J. A.; CHOI, E. S.; KIM, H. S.; HO, J. C.; WATTS, F. Z.; DAI PARK, S.; JANG, Y.  
939 K. SUMO Modification Is Involved in the Maintenance of Heterochromatin Stability in  
940 Fission Yeast. **Molecular Cell**. v. 19, p. 817-828, 2005.

941

942 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.  
943 **Experimental Cell Research**. v. 74, p. 304-306, 1972.

944

945 UESHIMA, N. **Hemiptera II**: Heteroptera. – In: Bernard, J. (ed.), Animal cytogenetics.  
946 Insecta. Berlin-Stuttgart. v. 3, n°2, 1979.

947

948 VÍTKOVÁ, M.; FUKOVÁ, I.; KUBIČKOVÁ, S. MAREC, F. Molecular divergence of the W  
949 chromosome in pyralid moths (Lepidoptera). **Chromosome Research**. v. 15, p. 917-930,  
950 2007.

951

952 WHITING, M. F. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence.  
953 **Zoologica Scripta**. v. 31, n°1, p. 3-15, 2002.

954

955

956

957

958 **TABELA 1** – Dados dos sistemas de determinação sexual e localização de DNAr 18S no gênero *Belostoma* (2n:  
959 número diploide; FISH: Hibridização fluorescente *in situ*; A: autossomos; S: Cromossomos Sexuais; \*: *Clusters*  
960 de DNAr 18S).

Espécies	2n (machos)	DNAr 18S		Referências
			FISH	
<i>Belostoma bergi</i> (Montandon,1899)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi e Bressa 2004.
<i>B. bifoveolatum</i> (Spinola,1852)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi 1991, Chirino e Bressa 2011.
<i>B. candidulum</i> (Montandon, 1903)	14 + XY	--		Bardella et al. 2012.
		S*		Presente estudo.
<i>B. cummingsi</i> (De Carlo,1935)	12+XY	S*		Chirino; Bressa, 2014.
	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi e Bidau 1985.
<i>B. dentatum</i> (Mayr, 1863)	22+ XY	S* A*		Presente estudo.
	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi e Bidau 1985, Papeschi 1991, Chirino et al., 2013.
<i>B. dilatatum</i> (Dufour, 1863)		A*		Presente estudo.
	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi 1992.
<i>B. discretum</i> (Montandon, 1903)	26 +	--		Bardella et al. 2012.
	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	A*		Presente estudo.
<i>B. elegans</i> (Mayr, 1871)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi 1992, Chirino e Bressa 2011.
		S*		Presente estudo
<i>B. elongatum</i> (Montandon, 1908)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	A*		Papeschi 1988, 1991, Papeschi e Bidau 1985, Papeschi e Bressa 2006.
		A*		Papeschi e Bressa 2006, Chirino et al. 2013, Presente estudo.
<i>B. gestroi</i> (Montandon, 1903)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	A*		Papeschi e Bressa 2006, Chirino et al. 2013.
<i>B. horvathi</i>	14 + XY	S*		Presente estudo.
<i>B. martini</i> (Montandon, 1899)	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--		Papeschi 1991.
<i>B. micantulum</i> (Stål, 1860)	14 + XY	S*		Papeschi 1988, Papeschi e Bressa 2006.
<i>B. orbiculatum</i> (Estévez e	14 + XY	--		Papeschi 1996, Chirino e

Continua

Polhemus, 2001)			Bressa 2011.
	14 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--	Papeschi 1996.
<b>Espécies</b>	<b>2n (machos)</b>	<b>DNAr 18S FISH</b>	<b>Referências</b>
<i>B. oxyurum</i> (Dufour, 1863)	6 + XY	S*	Papeschi 1988, 1995, Papeschi e Bressa 2006.
	14 + XY	--	
<i>B. plebejum</i> (Stål, 1858)	13 + XY	--	Papeschi 1994.
	14 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	--	
<i>B. testaceopallidum</i>	26 + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	A*	Presente estudo.

961

962

963

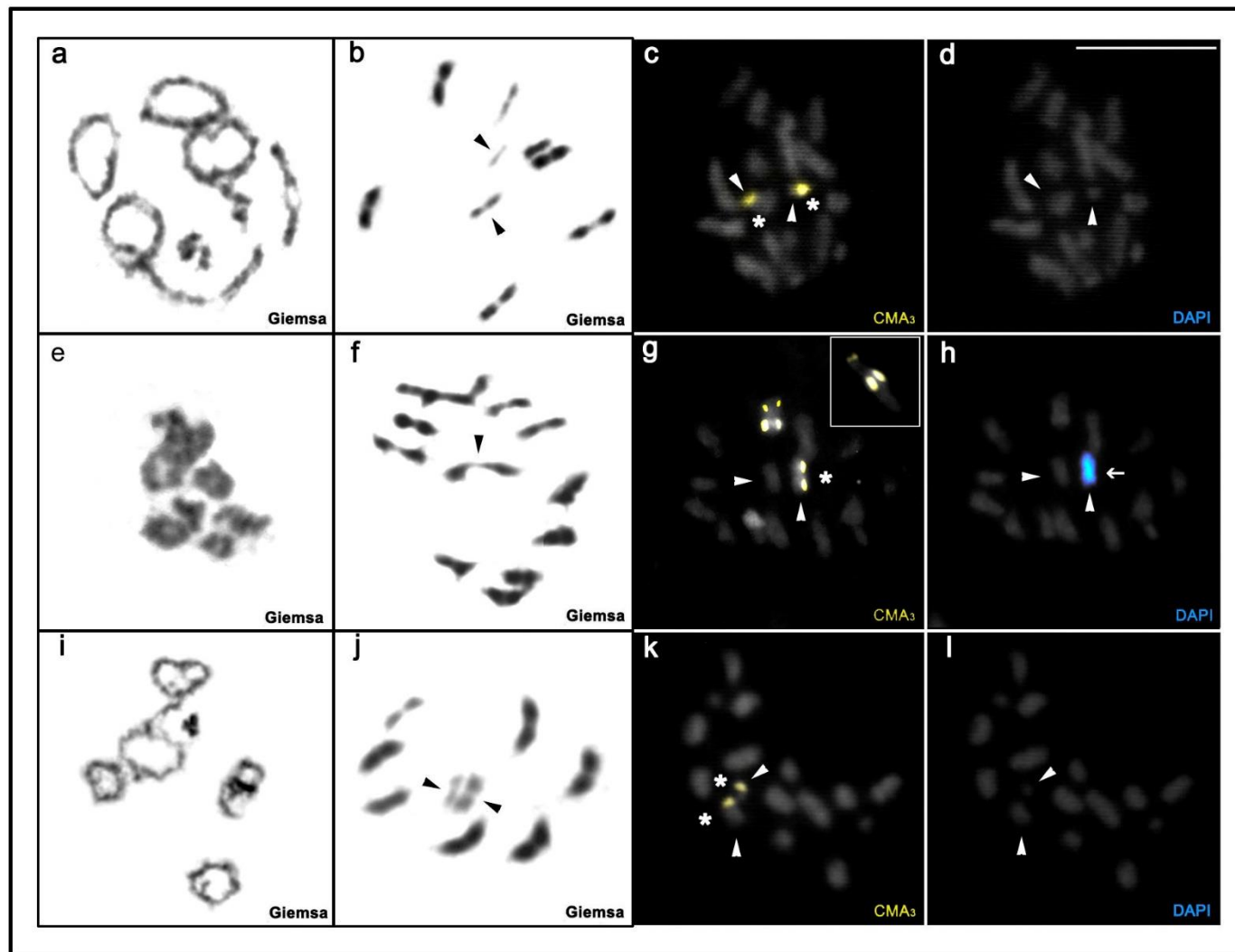
964

965

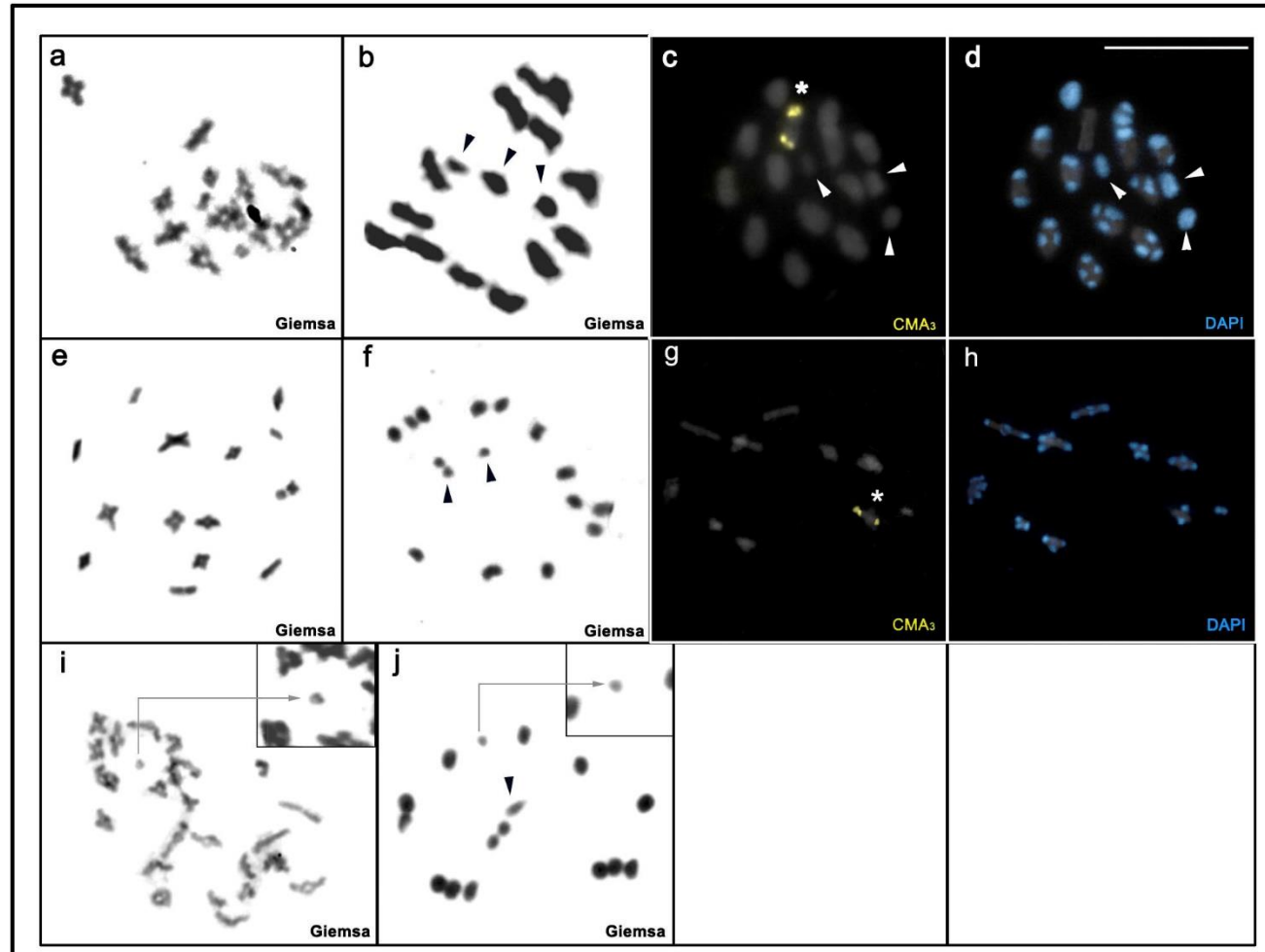
**TABELA 2** – Espécies estudadas e seus respectivos locais de coleta.

<i>ESPÉCIES</i>	<i>Nº DE INDIVÍDUOS</i>	<i>LOCAIS DE COLETA</i>
<i>B. candidulum</i>	8	Ribeirão Água do Macuco – Rio Paranapanema – Cândido Mota – PR (S 22° 54' 15.3" O 50° 23' 47.98")
<i>B. cummingsi</i>	7	Rio Taquari – Jataízinho – PR (S 23° 56' 9.65" O 51° 29' 26.08")
<i>B. dentatum</i>	13	Rio Miranda – Corumbá– Pantanal – MS (S 19° 31' 24.96" O 57° 02' 25.51")
<i>B. dilatatum</i>	13	Ribeirão Água do Macuco – Rio Paranapanema – Cândido Mota – PR (S 22° 54' 15.3" O 50° 23' 47.98")
<i>B. discretum</i>	3	Rio Paranapanema – Reservatório Rosana/Lagoa II – Teodoro Sampaio – SP (S 22°38'42,27"O 52°09'31,81')
<i>B. elongatum</i>	2	Rio Paranapanema – Reservatório Rosana/Lagoa II – Teodoro Sampaio – SP (S 22°38'42,27"O 52°09'31,81')
<i>B. horvathi</i>	17	Ribeirão Água do Macuco – Rio Paranapanema – Cândido Mota – PR (S 22° 54' 15.3" O 50° 23' 47.98")
<i>B. testaceopallidum</i>	14	Rio Quexada – Borrazópolis – PR (S 23° 10' 45.2" O 50° 56' 30.9")

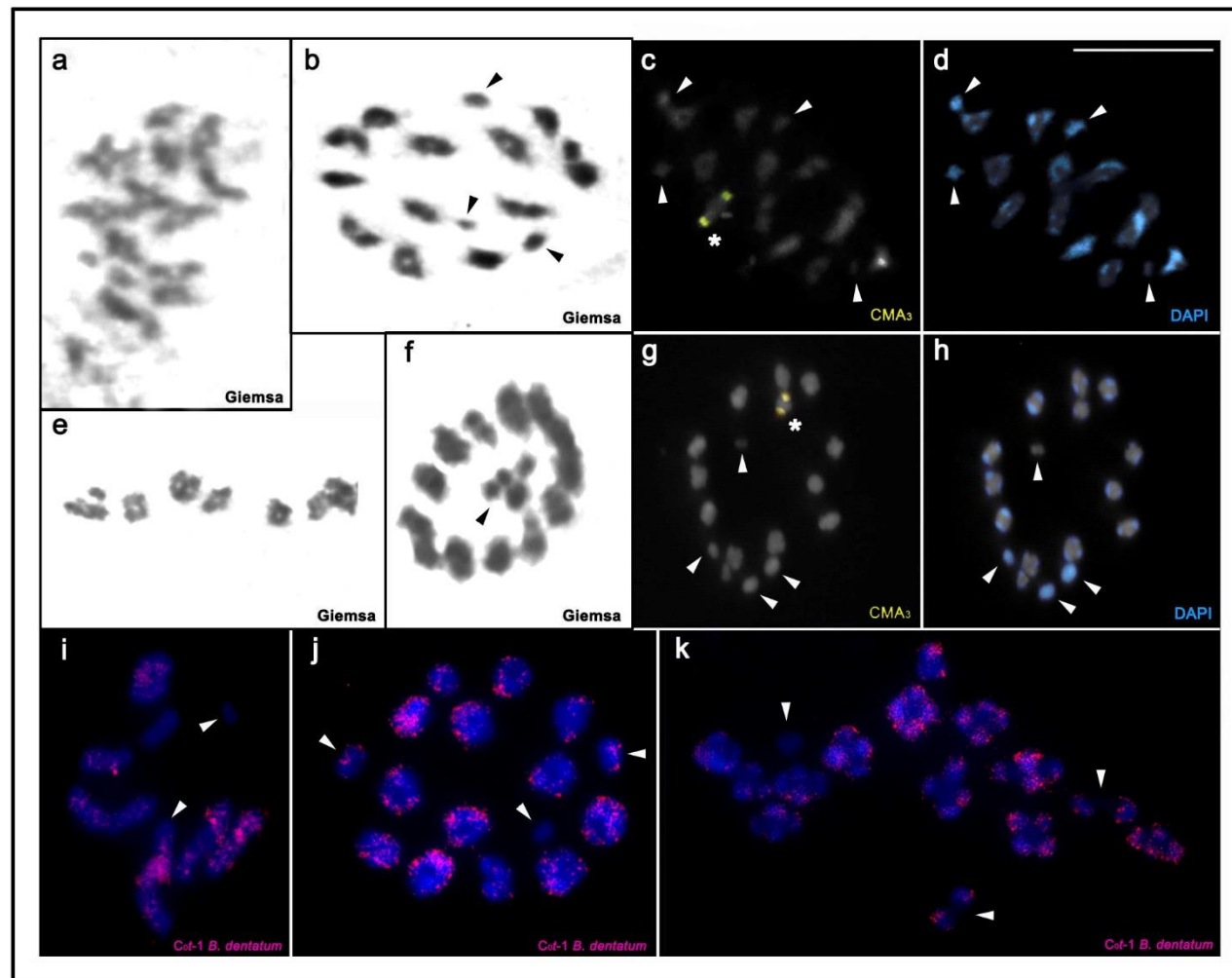
966



**FIGURA 1** – Fases mitóticas e meióticas com colorações convencionais e com fluorocromos base específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) de três espécies do gênero *Belostoma*. **a – d) *Belostoma horvathi*. **a.** Diplóteno/Diacinese parcial **b.** Metáfase I **c.** Metáfase mitótica **d.** Metáfase mitótica; **e – h)** *B. cummingsi*. **e.** Diplóteno/Diacinese parcial **f.** Metáfase II **g.** Metáfase II **h.** Metáfase II; **i – l)** *B. candidulum* **i.** Diplóteno/Diacinese parcial **j.** Metáfase I **k.** Metáfase II **l.** Metáfase II. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI<sup>+</sup>. Os asteriscos indicam os blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.**

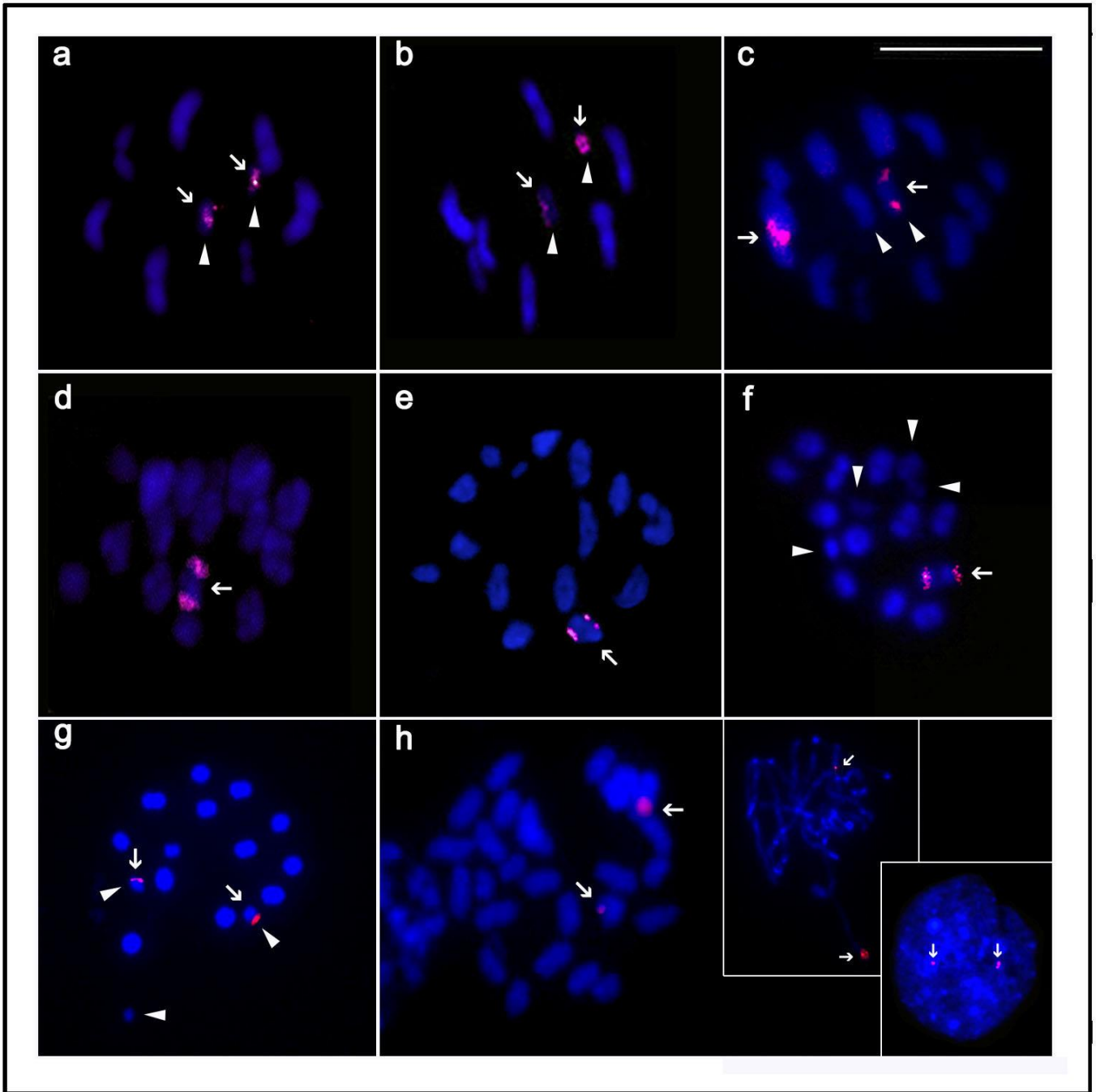


**FIGURA 2** – Fases meióticas com coloração convencional e com fluorocromos base específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) de três espécies do gênero *Belostoma*. **a – d)** *Belostoma dentatum*. **a.** Diplóteno/Diacinese **b.** Metáfase II **c.** MetáfaseII **d.** MetáfaseII; **e – h)** *B. elongatum*. **e.** Diplóteno/Diacinese **f.** Metáfase II, **g.** Diplóteno/Diacinese parcial, **h.** Diplóteno/Diacinese parcial; **i – l)** *Belostoma discretum*. **i.** Diplóteno/Diacinese **j.** Metáfase II. (Nos quadros pequeno cromossomo autossômico em evidência). As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI<sup>+</sup>. Os asteriscos indicam os blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.

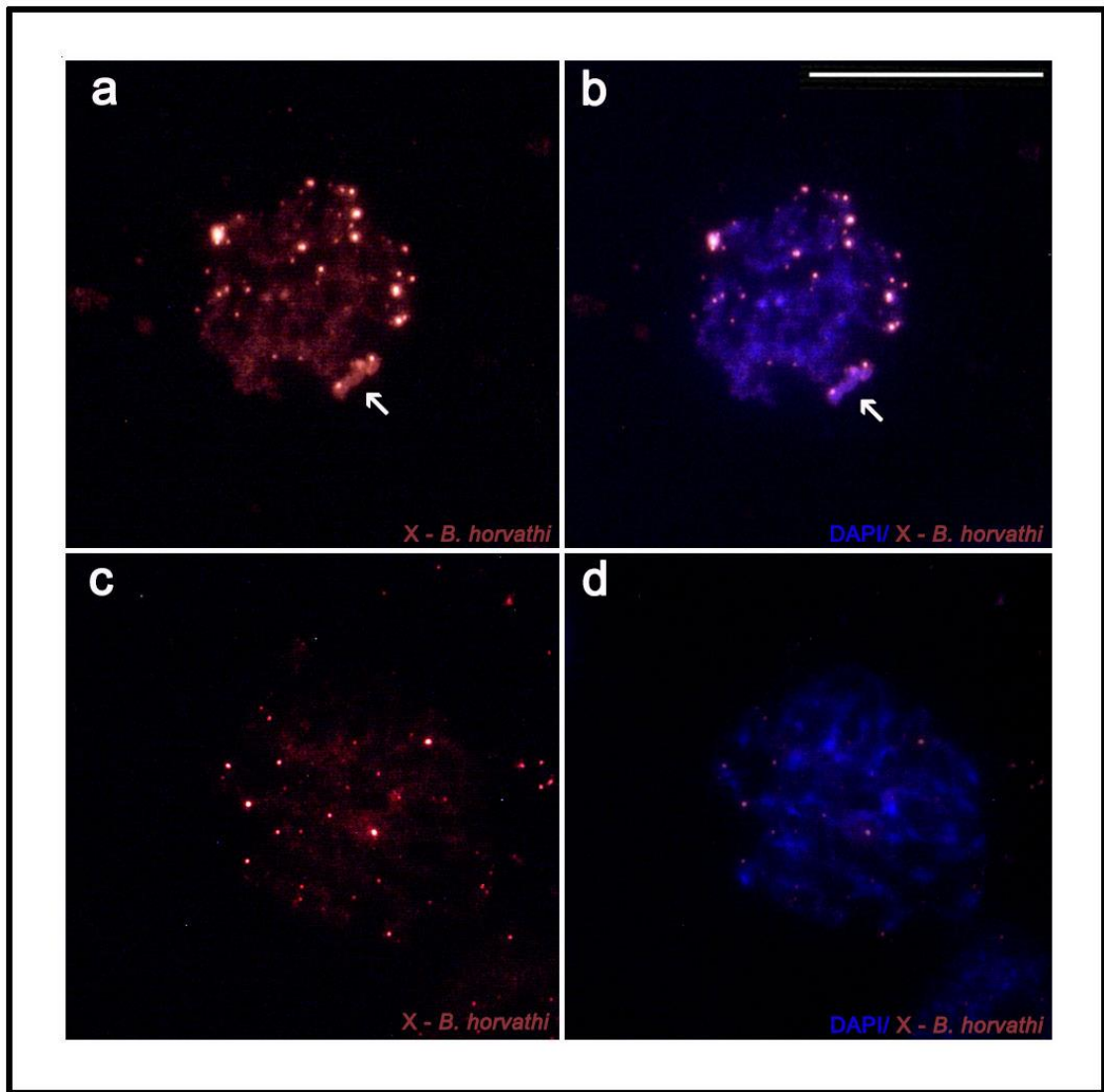


970

**FIGURA 3** – Fases meióticas com coloração convencional, fluorocromos base específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) e Hibridização fluorescente *in situ* com sonda da porção C<sub>0</sub>t-1 isolada de *B. dentatum*, de duas espécies do gênero *Belostoma*. **a – d)** *Belostoma testaceopallidum*. **a.** Diplóteno/Diacinese **b.** Metáfase II parcial **c.** Metáfase II **d.** Metáfase II; **e – h)** *B. dilatatum*. **e.** Diplóteno/Diacinese parcial **f.** Metáfase II, **g.** Metáfase II **h.** Metáfase II; **i** Metáfase II de *Belostoma horvathi*. **j.** Metáfase II de *B. dentatum*; **k.** Diplóteno/Diacinese de *B. dentatum*. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais. As setas indicam os blocos DAPI<sup>+</sup>. Os asteriscos indicam os blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.



**FIGURA 4** - Hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S. **a.** Metáfase II de *B. horvathi*. **b.** Metáfase II de *B. candidulum*. **c.** Metáfase II de *B. cummingsi*. **d.** Metáfase II de *B. dentatum*. **e.** Metáfase II de *B. testaceopallidum*. **f.** Metáfase II de *B. dilatatum*. **g.** Metáfase II de *Belostoma discretum*. **h.** Metáfase mitótica de *B. elongatum* (nos quadros: paquíteno e núcleo interfásico). As setas indicam os *clusters* de DNAr 18S. As cabeças de seta indicam os cromossomos sexuais.



972 **FIGURA 5** – Hibridização fluorescente in situ com sonda do cromossomo X microdissectado de *B.*  
 973 *horvathi*. **a,b.** Paquíteno inicial de *B. horvathi*. **c,d.** Paquíteno inicial de *B. dentatum*. As setas indicam o  
 974 bloco heteropicnótico correspondente ao cromossomo X.

972

973

974

975

976

977

978

979

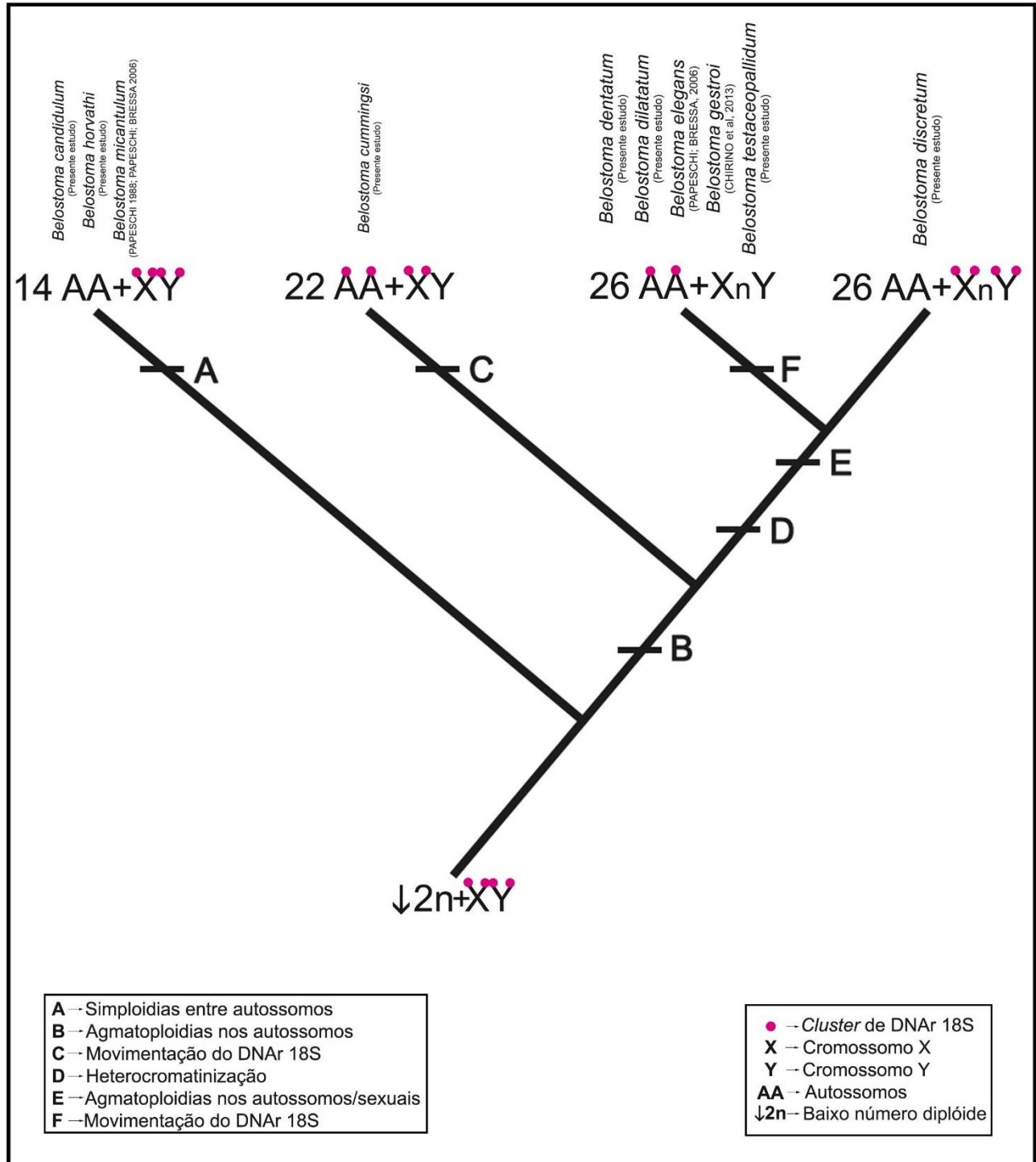
980

981

982

983

984



985 **FIGURA 6** – Esquema representativo da nova hipótese de evolução cromossômica para o gênero  
 986 *Belostoma*.

987

988

989

990

991

## 991 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

Em síntese, os dados aqui obtidos como a caracterização citogenética de duas novas espécies, novos padrões de localização de DNAr 18S e a análise da composição dos cromossomos sexuais em espécies com diferentes sistemas de determinação sexual, confirmam a grande diversidade cariotípica do gênero *Belostoma*, e são fortes indicativos de que o processo evolutivo continua ocorrendo e deve ser considerado com atenção. Estudos mais aprofundados acerca da diversidade no gênero, da composição genômica e a utilização de marcadores cromossômicos devem ser realizados para que linhas evolutivas sejam confirmadas, e as dúvidas sobre a evolução do grupo sejam respondidas. Tendo em vista a complexidade cariotípica do gênero *Belostoma*, este pode ser um importante objeto de estudos para a elaboração de modelos que auxiliem na resolução de problemas nos mais diversos grupos de organismos.

1025 **REFERÊNCIAS**

1026

1027 ABÍLIO, F. J. P., MELO, T. L. R.; SOUZA, A. H. F. F.; FLORENTINO, H. S.; OLIVEIRA  
 1028 JUNIOR, E. T.; MEIRELES, B. N.; SANTANA, A. C. D. Macroinvertebrados bentônicos  
 1029 como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia**  
 1030 **Brasiliensia**. v. 3, p. 397-409, 2007.

1031

1032 ARNETT, R. H. **American insects: a handbook of the insects of America north of Mexico.**  
 1033 Boca Raton, USA: CRC Press, v. 2, 1.003 p. 2000.

1034

1035 BACHTROG, D. A dynamic view of sex chromosome evolution. **Current Opinion in**  
 1036 **Genetics and Deveopment**. v. 16, p. 578–585, 2006.

1037

1038 BARDELLA, V. B. **Comportamento e organização dos cromossomos holocêntricos de**  
 1039 **heterópteros da região Sul do Brasil baseados em sequencias repetitivas DNA, meiose e**  
 1040 **análise ultraestrutural**. 2014. 125f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual  
 1041 Paulista “Julio Mesquita Filho” – Campus São José do Rio Preto. São José do Rio Preto.  
 1042 2014.

1043

1044 BARDELLA, V. B.; DIAS, A. L.; GIULIANO, L. C.; RIBEIRO, J. R. I.; DA ROSA, R. Sex  
 1045 chromosome differentiation in *Belostoma* (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae). **Genetics**  
 1046 **and Molecular Research**. v. 11, n. 3, 2012.

1047

1048 BARDELLA, V. B.; FERNANDES, T.; VANZELA, A. L. L. The conservation of number  
 1049 and location os 18s sites indicates the relative stability of rDNA in species of *Pentatomorpha*  
 1050 (Heteroptera). **Genome**. 18 p, 2013.

1051

1052 BARDELLA, V. B.; GAETA, M. L.; VANZELA, A. L. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T.  
 1053 V. Chromossomal location of heterochromatin and 45s rDNA sites in four South American  
 1054 triatomines (Heteroptera: Reduviidae). **Comparative Cytogenetics**. v. 4, n° 2, p. 141-149,  
 1055 2010.

1056

1057 BORROR, D. J.; DE LONG, D. M.; TRIPLEHORN, C. A. **An introduction to the study of**  
 1058 **insects**. Saunders College Publishing, USA. v. 5, 928 p. 1981.

1059

1060 BORROR, D. J.; WHITE, R. E. **A field guide to insects America north of Mexico**. New  
 1061 York, USA: Peterson Field Guide series, Houghton Mifflin Company. 404 p, 1970.

1062

- 1063 BRESSA, M. J.; PAPESCHI, A. G.; VÍTKOVÁ, M.; KUBÍCKOVÁ, S.; FUKOVÁ, I.;  
 1064 PIGOZZI, M. I.; MAREC, F. Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus  
 1065 *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 292-  
 1066 305, 2009.
- 1067 CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of  
 1068 repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an  
 1069 association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity  
 1070 between the B chromosome and A complement. **Heredity**. v. 104, p. 393–400, 2010.
- 1071
- 1072 CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of  
 1073 RNAs and Histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabeidae,  
 1074 Scarabeinae) beetles. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 134, p. 127-135, 2011.
- 1075
- 1076 CABRERO, J.; BUGROV, A.; WARCHALOWSKA-SLIWA, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.;  
 1077 PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Comparative FISH analysis in five species of  
 1078 *Eyprepocnemidine grasshoppers*. **Heredity**. v. 90, p. 377-381. 2003.
- 1079
- 1080 CALLISTO, M.; MORENO, P.; BARBOSA, F. A. R. Habitat diversity and bathic  
 1081 functional trophic groups at Serra do Cipó, Southeast Brazil. **Rev. Brasil. Biol.** v. 6, n° 2, p.  
 1082 259-266. 2001.
- 1083
- 1084 CATTANI, M. V.; GREIZERSTEIN, E. J.; PAPESCHI, A. G. Male meiotic behaviour and  
 1085 nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr.) (Coreidae, Heteroptera)  
 1086 analyzed by fluorescent banding and in situ hybridization. **Caryologia**. v. 57, n° 3, p. 267-  
 1087 273. 2004.
- 1088
- 1089 CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of  
 1090 repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. v. 371, p. 215–220, 1994.
- 1091
- 1092 CHICKERING, A. M. An unusual complex in *Lethocerus*. **Anat. Rec.** v. 37, p. 156, 1927.
- 1093
- 1094 CHICKERING, A. M. Spermatogenesis in the Belostomatidae. III. The chromosomes in the  
 1095 male germ cells of a *Lethocerus* from New Orleans, Louisiana. **Pap. Mich. Acad. Sci.** v. 15,  
 1096 p. 357-360, 1932.
- 1097
- 1098 CHIRINO, M. G.; BRESSA, M. J. Caracterización de la heterocromatina en tres especies del  
 1099 género *Belostoma* (Hemiptera: Belostomatidae). In III Simposio Latinoamericano de  
 1100 Citogenética y Evolución, XL Congreso Argentino de Genética, I Jornadas SAGNEA.  
 1101 Corrientes, Argentina, December 1-3, 2011.
- 1102

- 1103 CHIRINO, M. G.; PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. The significance of cytogenetics for  
 1104 the study of karyotype evolution and taxonomy of water bugs (Heteroptera, Belostomatidae)  
 1105 native to Argentina. **Comparative cytogenetics**. v.7, n. 2, p. 9 – 27, 2013.
- 1106 CHIRINO, M. G; BRESSA, M. J. Karyotype evolution in progress: A new diploide number  
 1107 in *Belostoma candidulum* (Heteroptera: Belostomatidae) from Argentina a leading to new  
 1108 insights into its ecology and evolution. **European Journal of Entomology**. v. 111, nº 2, p.  
 1109 165-174. 2014.  
 1110
- 1111 FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. **Rev. Colomb. Entomol.** v. 34, n. 1, p. 1–21.  
 1112 2008.  
 1113
- 1114 GUERRA, M.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; ARANA, P.; PUERTAS, M. J. Mitotic  
 1115 microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of  
 1116 *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). **Genetica**. v. 126, p. 33-41, 2006.  
 1117
- 1118 GUERRA, M.; CABRAL, G.; CUACOS, M.; GONZÁLES-GARCIA, M.; GONZÁLES-  
 1119 SANCHES, M.; VEJA, J.; PUERTAS, M. J. Neocentrics and holokinetics (holocentrics):  
 1120 chromosomes out of the centromeric rules. **Cytogenetic Genome Research**. v. 129, n. 1-3,  
 1121 p. 82-96, 2010.  
 1122
- 1123 GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os Insetos um resumo da entomologia**. 3ªed. São  
 1124 Paulo: Roca, 440 p. 2008.  
 1125
- 1126 HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The kinetochore of the Hemiptera.  
 1127 **Chromosoma**. v. 19, n. 1, p. 327-350, 1961.  
 1128
- 1129 KUZNETSOVA, V. G.; GROZEVA, S. M.; ANOKHIN, B. A. The first finding of (TTAGG)<sub>n</sub>  
 1130 telomeric repeat in chromosomes of true bugs (Heteroptera, Belostomatidae). **Comparative**  
 1131 **Cytogenetics**. v. 6, nº 4, p. 341-346, 2012.  
 1132
- 1133 LATREILLE, P. A. **Considérations générales sur l'ordre naturel des animaux composant**  
 1134 **les classes des crustacés, des arachnides, et des insectes; avec un tableau méthodique de**  
 1135 **leurs genres, disposés en familles**. Paris, France: F. Schoell, 444 p, 1810.  
 1136
- 1137 LAUCK, D. R.; MENKE, A. S. The higher classification of the Belostomatidae (Hemiptera).  
 1138 **Annals of the Entomological Society of America**. v. 54, n. 5, p. 644-657, 1961.  
 1139
- 1140 LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of**  
 1141 **Biochemistry**. v.49, p. 727-764, 1980.

1142

1143 MANNA, G. K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. - In: Sharma AK, Sharma, A  
1144 (ed), Chromosomes in evolution of eukaryotic groups. Boca Raton, Florida, USA. p. 189–  
1145 225, 1984.

1146 MELTERS, D.P.; PALIULIS L.V.; KORF, I.F.; CHAN, W.L. Holocentric chromosomes:  
1147 convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research**. v.  
1148 20, p. 579-593, 2012.

1149

1150 MOLA L. M.; PAPESCHI A. G. Holokinetic chromosomes at a glance. **Journall of Basic  
1151 and Applied Genetics**. v. 17, p. 17– 33, 2006.

1152

1153 MOLA, L. M.; PAPESCHI, A. G.; Citogenética de *Dysdercus chaquensis* (Heteroptera:  
1154 Pyrrhocoridae). **Ver. Soc. Entomol. Argent.** v. 56, p. 20, 1997.

1155

1156 MOTZKO, D.; RUTHMANN, A. Spindle membranes in mi- tosis and meiosis of the  
1157 heteropteran insect Dysder- cus intermedius. A study of the interrelationship of spindle  
1158 architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European journal of cell biology**.  
1159 v. 33, p. 205-216, 1984.

1160

1161 PAPESCHI, A. G. C-banding and DNA content in three species of *Belostoma* (Heteroptera)  
1162 with large differences in chromosome size and number. **Genetica**. v. 76, n. 1, p. 43-51, 1988.

1163

1164 PAPESCHI, A. G. Chromosome Rearrangements in *Belostoma plebejum* (Stal)  
1165 (Belostomatidae, Heteroptera). **Caryologia**. v. 47, n. 3-4, p. 223-231, 1994.

1166

1167 PAPESCHI, A. G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes  
1168 of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). **Cytologia**. v. 60, n° 3, p. 291–295,  
1169 1995.

1170

1171 PAPESCHI, A. G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma*  
1172 (Heteroptera, Belostomatidae). **Hereditas**. v. 115, p. 109-114, 1991.

1173

1174 PAPESCHI, A. G. **Estudios citogenéticos y evolutivos em Heteroptera**. 1992. Tese  
1175 (Doutorado) Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. 1992.

1176

1177 PAPESCHI, A. G. Sex chromosome polymorphism in a species of *Belostoma*  
1178 (Belostomatidae, Heteroptera). **Hereditas**. v. 124, n. 3, p. 269-274, 1996.

1179

- 1180 PAPESCHI, A. G.; BIDAU, C. J. Chromosome complement and male meiosis in four species  
1181 of *Belostoma* Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). *Brazilian Journal of Genetics*. v. 8, n°  
1182 2, p. 249–261, 1985.  
1183
- 1184 PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of**  
1185 **Biological Research**. v. 5, p. 3-21, 2006.  
1186
- 1187 PÉREZ, R.; RUFAS, J.; SUJA, J.; PANZERA, F. Meiosis in holocentric chromosomes:  
1188 orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans*  
1189 (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 8, p. 17-25, 2000.  
1190
- 1191 PIERCE, B. A. **Genética**: um enfoque conceitual. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan  
1192 S.A. 2004. 758 p.  
1193
- 1194 RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. London: Elsevier. v. 2, 1132 p, 2009.  
1195
- 1196 RIBEIRO, J. R. I. Família Belostomatidae Leach, 1815 (Insecta: Hemiptera: Heteroptera):  
1197 chave e catálogo de identificação para as espécies ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro,  
1198 Brasil. **Arquivo Mus. Nac.** v. 63, n. 2, p. 247-262, 2005.  
1199
- 1200 RIBEIRO, J. R. I.; ALECRIM, V. D. Duas novas espécies de *Belostoma* Latreille, 1807  
1201 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) do grupo *plebejum sensu* Neiser, 1975. **Acta**  
1202 **Amazônica**. v. 38, n° 1, 2008.  
1203
- 1204 SAHA, N.; ADITYA, G.; SAHA, G. K.; HAMPTON, S. E. Opportunistic foraging by  
1205 heteropteran mosquito predators. **Aquatic Ecology**. v. 44, p. 167-176, 2010.  
1206
- 1207 SCHLEE, D. Morphologie und symbiose; ihre beweiskraft für die verwandtschafts  
1208 beziehungen der Coleorrhyncha (Insecta, Hemiptera). Phylogenetische studien an Hemiptera  
1209 IV.: Heteropteroidea (Heteroptera + Coleorrhyncha) als monophyletische gruppen.  
1210 **Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde**. v. 210, p. 1-27, 1969.  
1211
- 1212 SCHUH, R. T. [Review of] Evolutionary trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures  
1213 and feeding strategies. **Systematic Zoology**. v. 28 n. 4, p. 653-656, 1979.  
1214
- 1215 SCHUH, R. T.; SLATER, J. A. **True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera):**  
1216 **classification and natural history**. Ithaca, NY: Cornell University Press. 336 p., 1995.  
1217

- 1218 THOMAS, D. B. J. Chromosome evolution in the Heteroptera (Hemiptera): agmatoploidy  
1219 versus aneuploidy. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 80, n. 6, p. 720–  
1220 730, 1987.
- 1221
- 1222 TRAUT, W.; SAHARA, K.; OTTO, T. D.; MAREC, F. Molecular differentiation of sex  
1223 chromosomes probe by comparative genome hybridization. **Chromossoma**. v. 108, p. 173-  
1224 180, 1999.
- 1225
- 1226 UESHIMA, N. **Hemiptera II**: Heteroptera. – In: Bernard, J. (ed.), Animal cytogenetics.  
1227 Insecta. Berlin-Stuttgart. v. 3, n°2, 1979.
- 1228 WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. Systematics and evolution of Heteroptera. **Annual Review of**  
1229 **Entomology**, v. 56, p. 487-510, 2011.
- 1230
- 1231 WHEELER, W. C.; SCHUH, R. T.; BANG, R. Cladistic congruence among higher groups of  
1232 Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. **Entomologica**  
1233 **Scandinavica**. v. 24, p. 121-137, 1993.
- 1234
- 1235
- 1236
- 1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

**APÊNDICES**

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

## APÊNDICE A

1256 Sequencia consenso do fragmento contido no clone 11, isolado da porção C<sub>0</sub>t-1

1257 &gt; pBd\_11

1258 TTTTGTA AAAACGTACGCCAGTGAATTTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCGATATACGATACAAAAT  
1259 AGAAATAAAATTAGTAAGAAACGGAGAGACACGATCGGGGAATGACAAGAGGAATGGAACGGGT  
1260 TAGAGAAGGGTAAAAATACCGATGAATATTTTTATCGAGAACTCGCAAACTCCAAGCGCGGTTTG  
1261 TATCCATTTCAAGAGTCTCGGGGACCGTCTTATAGTAAGGCATCCGTCCGACCTTTGACCTTTGCTC  
1262 GGTCCGCAATCCATATGACTAGTAGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCCTAT  
1263 AGTGAGTCGTATTAGAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGA

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 9XC1F0A8D14

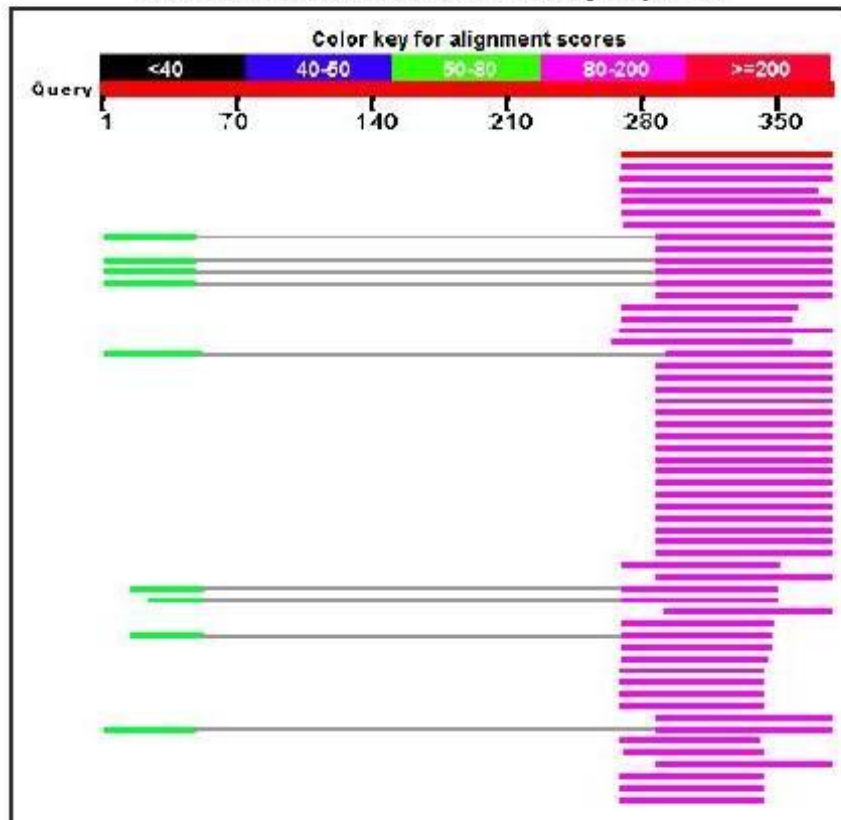
- [Formatting options](#)
- [Download](#)
- [Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (379 letters)

<b>RID</b>	9XC1F0A8D14 (Expires on 01-21 04:52 am)	<b>Database Name</b>	nr
<b>Query ID</b>	Id Query_40809	<b>Description</b>	Nucleotide collection (nr)
<b>Description</b>	None	<b>Program</b>	BLASTN 2.3.0+
<b>Molecule type</b>	nucleic acid		
<b>Query Length</b>	379		

Graphic Summary

Distribution of 135 Blast Hits on the Query Sequence



## Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>S.salar</i> microsatellite DNA, GT-repeat (GT) <sup>15</sup>	200	200	28%	2e-47	100%	<a href="#">Y11447.1</a>
<i>S.salar</i> microsatellite DNA, GT-repeat (TG) <sup>10</sup>	195	195	28%	7e-46	99%	<a href="#">Y11449.1</a>
<i>S.salar</i> microsatellite DNA, CAG-repeat (CAG) <sup>6</sup>	193	193	28%	3e-45	98%	<a href="#">Y11458.1</a>
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. gene for 16S rRNA, clone: A01	187	187	26%	1e-43	100%	<a href="#">AB159742.1</a>
Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CN OX1-B18	183	183	28%	2e-42	97%	<a href="#">AB193872.2</a>
<i>Secale cereale</i> DNA, clone: P9, rye chromosome 1 R specific fragment	182	354	26%	6e-42	99%	<a href="#">AB669624.1</a>
Uncultured glomeromycoete gene for large subunit rRNA, partial sequence, clone: E12_33-1	174	174	28%	1e-39	95%	<a href="#">AB280253.1</a>
Cloning vector pDNI9, complete sequence	169	238	36%	5e-38	100%	<a href="#">AF327711.1</a>
<i>Escherichia coli</i> pCA4 plasmid microsatellite	169	169	24%	5e-38	100%	<a href="#">AJ438270.1</a>
Phagemid cloning vector pTZ19 U, complete sequence	169	238	36%	5e-38	100%	<a href="#">Y14836.1</a>

## Alignments

*S.salar* microsatellite DNA, GT-repeat (GT)<sup>15</sup>

Sequence ID: emb|Y11447.1| Length: 313 Number of Matches: 1  
Range 1: 149 to 256

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
200 bits (108)	2e-470	108/108 (100%)	0/108 (0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query	271	AATCCATATGACTAGTAGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCCCTATA			338
Sbjct	149	AATCCATATGACTAGTAGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCCCTATA			208
Query	331	GTGAGTCGTAATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTG			378
Sbjct	289	GTGAGTCGTAATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTG			256

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

## APÊNDICE B

1278

Sequencia consenso do fragmento de DNAr 18S.

1279

&gt;pBh\_18S\_c2

1280

1281 GAGTCTCGTTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCGTTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCA

1282 CTATCCATTGAATCAAGAGAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTCCAATGTCCGGGCCTGATGAGGT

1283 TCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTA

1284 AGTTTCAGCTTTGCAACCATACTTCCCCCGGAACCCAAAAGCTTTGGTTTCCCGGAAGCTGCCCGCC

1285 GAGTCATCGGAGGAACATCGGCGGATCGCTGGCTGGCATCGTTTATGGTTAGAACTAGGGCGGTAT

1286 CTGATCGCCTTCGAACCTCTAACTTTCGTTCTTGATCAACTAAGACATACTTGGCAAATGCTTTCGC

1287 TTTAGTGCCTTTCGACGATCCAAGAATTTACCTCTAACGCCGCAATACGAATGCCCCGCCTGT

1288 CCATATTGATCATTACCTCGGGTTCCGAAAACCAACAAAATAGAACCAGGGTCTATTCAATTATT

1289 CCATGCACCACTATTCAGGCTGAGCTCAGCCTGCTTTGAGCACTCTAATTTGTTCAAAGTAAACGTG

1290 CCGGCCACCTCGACACTCAGTTAAGAGCACC GCGGGGATTAGATAGGGGACCGGGCGGATCCC

1291 GGGGGGGAGCTTCGGACCCGTTCCGGGTCTTACGCCCCGCCCGGGCCGCGGCCACCGGCA

1292 GGACATCCCACGGCGTGCCAGTTGCACCGACAGGCGGTGAACCGACAGCGTGGGACGCAGGACCA

1293 ACTACGAGCTTTTTAACC GCAACAACCTTTAATATACGCCATTGGAGCTGGAATTACCGGGCTGCT

1294 GGCACCAGACTTGCCCTCCAATAGGTACTTGTTAAATGATTTAGAGTGTGCTCATTCCGATTACGGG

1295 GCCTCGGATGAGTCCCGTATCGTTATTTTTTGTCACTACCTCCCCGTGCCGGGAGTGGGTAATGTGC

1296 GTGCCTGCTGCCTTCCTTG

1297

1298

# BLAST®

## Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn\\_suite/](#) Formatting Results - X9J0KJ85016

[Formatting options](#)

[Download](#)

[Blast report description](#)

18s\_Bh\_c2

**RID** [X9J0KJ85016](#) (Expires on 08-21 02:16 am)

**Query ID** k|Query\_2.2579

**Database Name** nt

**Description** 18s\_Bh\_c2

**Description** Nucleotide collection (nt)

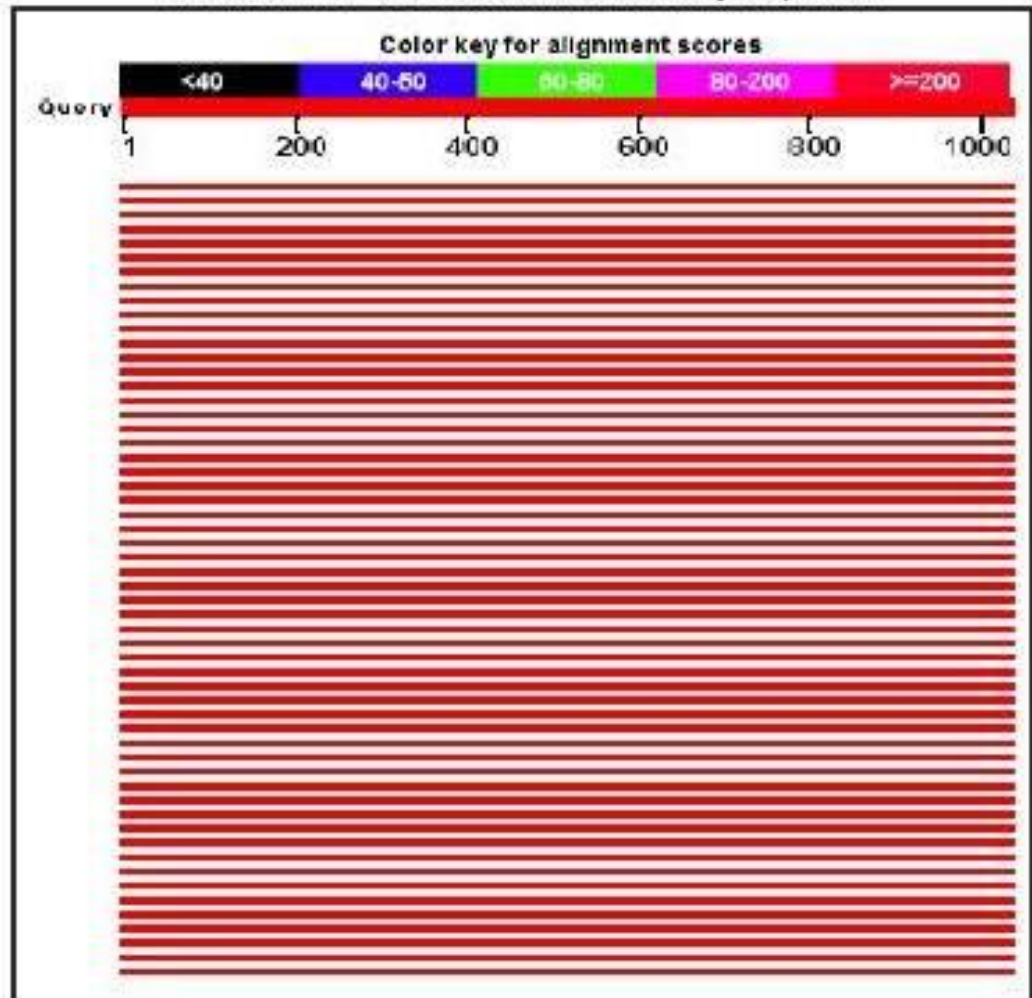
**Molecule type** nucleic acid

**Program** BLASTN 2.2.32+

**Query Length** 1037

### Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



1299

1300

