

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Taxonomia comparada, filogeografia e dinâmica populacional de *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): uma abordagem integrativa

Tamara Moraes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

Tamara Moraes
Bacharela em Agronomia

Taxonomia comparada, filogeografia e dinâmica populacional de *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): uma abordagem integrativa

Orientador:
Prof. Dr. **CRISTIANO FELDENS SCHWERTNER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Moraes, Tamara

Taxonomia comparada, filogeografia e dinâmica populacional de *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): uma abordagem integrativa / Tamara Moraes.
- - Piracicaba, 2018.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Dichelops* spp. 2. Pragas emergentes 3. Morfometria 4. Filogeografia
I. Título

“Espíritas! Amai-vos, eis o primeiro ensinamento; instruí-vos, eis o segundo.”

O Espírito de Verdade (Paris, 1860)

Aos espíritos amigos, por sempre iluminarem minha mente e meus caminhos,
AGRADEÇO.

Aos meus pais, Ademir e Denise, pelo amor incomparável, pelo constante incentivo e por serem meus melhores amigos. À minha irmã Tércia, por ser meu maior exemplo,
OFEREÇO e DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cristiano Feldens Schwertner, pela orientação, paciência, atenção e por compartilhar tanto conhecimento durante o período de mestrado. Agradeço grandemente pela oportunidade de trabalhar na área de taxonomia, e por todas as conversas que engrandeceram a minha formação acadêmica e profissional.

Ao professor Alberto Soares Corrêa pela coorientação, por me incluir ativamente no grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes, por estar sempre presente, atender às dúvidas, e por me ensinar, além da biologia molecular, a ter mais tranquilidade nos momentos de dificuldade.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes, pelos ensinamentos, troca de experiências, e convivência em equipe. Em especial à Cristina Jensen, Denise Alves, Daniela Maggio e Rosely Souza pela alegria que trazem aos meus dias, e por tornarem o meu segundo ano de mestrado mais leve e feliz.

Aos colegas da turma de 2017 do programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela troca de conhecimentos e amizade. Em especial à Aline Lira, Joel Couceiro e Beatriz Lima, por estarem presentes em todos os momentos nestes dois anos.

Aos meus primeiros orientadores na Entomologia, Luís Cláudio Paterno Silveira (UFLA) e Simone Martins Mendes (Embrapa Milho e Sorgo), pelas oportunidades durante a graduação, por me ensinarem o amor à Entomologia, e por sempre me incentivarem e confiarem na minha capacidade.

Aos amigos que o Ciência sem Fronteiras trouxe para a minha vida, Felipe Ferreira, Rodrigo Queconi, Alexia Batista, Lara Silva e João Tetzl e aos colegas de estágio da Embrapa Milho e Sorgo. Muito obrigada pela torcida e vibração positiva mesmo com toda a distância física.

Aos colaboradores de todo o Brasil pela contribuição nas coletas de percevejos; sem essas parcerias não seria possível concluir o trabalho: APTA Regional, Pindorama, SP (Marcos Michelotto); Casa da Agricultura, Itapetininga, SP (C. Salata); Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (José Alexandre BARRIGOSI e Gislaine Carvalho); Capitólio, MG (Natália Leite); Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS (Antonio R. Panizzi); Fundação MT, Rondonópolis, MT (Lucia Vivan e Ana Flávia Oliveira); Fundação MS, Maracaju, MS (Miriam Grigolli); UFAL, Penedo, AL (Kim Barão); UFSM, Santa Maria, RS (Frederico Hickmann); UFRGS, Porto Alegre, RS (Filipe Bianchi); Mineiros, GO (Rogério Machado); UFV- Campus Florestal,

Florestal, MG (Lessando Gontijo); Paranaíba, PR (Pablo Gontijo). Ao Bruno Genevcius, pela paciência, e por toda a ajuda nas análises estatísticas.

À Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela excelência das disciplinas e conhecimento compartilhado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os grandes amigos de infância de Sete Lagoas, por assegurarem nossa amizade firme e forte, apesar de os caminhos serem tão diferentes.

Ao Diego, por ser meu amigo e companheiro, e me ensinar todos os dias sobre amor e paciência.

Às companheiras de república, Brena e Ísis, por fazerem da nossa casa em Piracicaba um lar de amizade e tranquilidade.

À minha irmã Tércia, por ser minha grande amiga e meu grande exemplo. Aos meus pais Ademir e Denise, por todo o amor que sempre recebi, por sempre me incentivarem a buscar mais oportunidades, por me apoiarem em todas as decisões, e por toda a educação que me proporcionaram apesar de todas as dificuldades. À Deus, pela minha vida. Aos espíritos de luz, por guiarem o meu livre-arbítrio na direção do bem.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
REFERÊNCIAS	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. A FAMÍLIA PENTATOMIDAE.....	13
2.2. <i>DICHELOPS FURCATUS</i>	13
2.3. <i>DICHELOPS MELACANTHUS</i>	14
2.4. TAXONOMIA DE <i>D. FURCATUS</i> E <i>D. MELACANTHUS</i>	15
2.5. DANOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO PERCEVEJO BARRIGA-VERDE (<i>DICHELOPS</i> SPP.)	16
2.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E USO DE MÉTODOS MORFOMÉTRICOS	17
2.7. MARCADORES MITOCONDRIAIS.....	17
2.8. FILOGEOGRAFIA, DEMOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL	18
3. MORFOMETRIA COMPARADA DE <i>DICHELOPS</i> SPP. (HEMIPTERA: HETEROPTERA: PENTATOMIDAE).....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT	23
3.1. INTRODUÇÃO	24
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.2.1. Amostragem de indivíduos	27
3.2.2. Obtenção dos dados morfométricos	28
3.2.3. Análises estatísticas.....	30
3.1. RESULTADOS.....	31
3.1.1. Morfometria linear.....	31
3.1.2. Morfometria geométrica	34
3.2. DISCUSSÃO	39
3.3. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	41
4. DIVERSIDADE POPULACIONAL E FILOGEOGRAFIA DE <i>DICHELOPS FURCATUS</i> E <i>DICHELOPS MELACANTHUS</i> NO BRASIL	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT	43
4.1. INTRODUÇÃO	44
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.2.1. Amostragem de populações e extração de DNA	45
4.2.2. Amplificação dos genes <i>COI</i> e <i>16S</i> e sequenciamento de Sanger	47
4.2.3. Análises de diversidade, demografia e estrutura populacional	48
4.2.4. Inferências genealógicas e estimativa de tempo de divergência.....	49
4.3. RESULTADOS.....	49
4.4. DISCUSSÃO	60
4.5. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Taxonomia comparada, filogeografia e dinâmica populacional de *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): uma abordagem integrativa

Os percevejos barriga-verde (*Dichelops* spp.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) são considerados pragas emergentes em diferentes plantas cultivadas no Brasil. *Dichelops furcatus* (Fabricius) e *Dichelops melacanthus* (Dallas) são morfologicamente semelhantes, e os caracteres morfológicos são extremamente variáveis entre as espécies, trazendo em questão a delimitação e padrão de distribuição geográfico das mesmas. Baseado em ampla amostragem ao longo da distribuição de *Dichelops* spp., os objetivos gerais deste estudo foram: 1) estudar a diversidade morfológica de *D. furcatus* e *D. melacanthus* utilizando morfometria linear e geométrica; 2) definir ferramentas para a identificação das espécies reconhecidas a partir de dados morfológicos quantitativos; 3) a partir de ferramentas moleculares, testar a delimitação das espécies, estudar a diversidade, estruturação genética, e o padrão de distribuição geográfico das populações de *D. furcatus* e *D. melacanthus* no Brasil. Para isso, foram fotografadas as principais estruturas diagnósticas da morfologia geral (cabeça, pronoto e escutelo) dos indivíduos das populações estudadas e os dados de morfometria linear e geométrica analisados estatisticamente. DNA de indivíduos das duas espécies de diferentes populações do Brasil foi extraído, e dois genes mitocondriais (COI e 16s) foram amplificados por PCR e sequenciados. Resultados de morfometria geométrica mostraram grande sobreposição na forma entre as espécies, tornando esse método ineficiente na delimitação de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. A morfometria linear foi eficiente em delimitar *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Os resultados de diversidade e estruturação mostraram alta diversidade genética e alta estruturação genética entre as populações de ambas as espécies, suportando a existência de duas linhagens de *D. furcatus* e duas linhagens de *D. melacanthus*.

Palavras-chave: *Dichelops* spp.; Pragas emergentes, Morfometria; Filogeografia

ABSTRACT

Comparative taxonomy, phylogeography and population dynamics of *Dichelops furcatus* and *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): an integrative approach

The green-belly stink bugs *Dichelops* spp. (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) are considered emergent pests in different cultivated plants in Brazil. *Dichelops furcatus* (Fabricius) and *Dichelops melacanthus* (Dallas) are morphologically similar, and the morphological characteristics are variable within the species, sometimes overlapping between them, bringing into question the species delimitation. Based on wide sampling throughout the whole distribution of *Dichelops* spp., the goals of this study were: 1) to study the morphological diversity of *D. furcatus* e *D. melacanthus* using both traditional and geometric morphometrics, and 2) define tools for the species identification recognized from quantitative morphological data; 3) to study the genetic diversity, population structuring, and the geographical distribution pattern of *D. furcatus* and *D. melacanthus* populations in Brazil using molecular data. For that, digital photographs of the main morphological structures (head, pronotum and scutellum) were taken and statistical analysis of traditional and geometric morphometrics were made. DNA from individuals of both species from different populations of Brazil was extracted, and two mitochondrial genes (COI and 16s) were amplified by PCR and sequenced. Results from geometric morphometrics show that shape of pronotum, head and scutellum were strongly overlapping between species, making this method inefficient in separating *D. furcatus* from *D. melacanthus*. However, traditional morphometrics was efficient in separating the species. Results showed high genetic diversity and high genetic structuring between populations of both species, supporting the existence of two lineages for *D. furcatus* and two lineages for *D. melacanthus*.

Keywords: *Dichelops* spp.; Morphometrics; Emergent pests; Phylogeography.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam o grupo mais abundante e diverso entre os animais, sendo várias espécies consideradas pragas agrícolas no mundo. Devido à fácil adaptação em diferentes ecossistemas e condições edafoclimáticas, os insetos fitófagos podem causar a redução de produtividade das culturas agrícolas, e no pior dos casos, resultar na perda total da colheita (ZHANG et al., 2007).

No Brasil, o avanço da fronteira agrícola para o cerrado e a crescente intensificação dos sistemas de cultivo, especialmente a expansão do plantio direto e da segunda safra de milho, desencadearam o crescimento de populações de insetos anteriormente considerados pragas secundárias (PANIZZI, 1997; SMANIOTTO; PANIZZI, 2015). Dentro desse contexto, algumas espécies da família Pentatomidae vêm se destacando como importantes pragas em diversos cultivos na região Neotropical, devido ao aumento de sua ocorrência e elevado crescimento populacional (PANIZZI, 2015).

Dentro do complexo de pentatomídeos-praga, o percevejo barriga-verde (*Dichelops* spp.) é considerado praga-chave em cultivos de milho no Brasil (VALICENTE, 2015), sendo frequentemente encontrado em soja e trigo, devido ao cultivo sucessivo dessas culturas ao longo do ano (CHOCOROSQUI & PANIZZI, 2004). Este percevejo tornou-se uma praga importante em lavouras de milho segunda safra, em função dos danos significativos à cultura, sobretudo no início do desenvolvimento vegetativo, reduzindo o vigor e a população de plantas (GASSEN, 1996; CHOCOROSQUI, 2001; CORREA-FERREIRA et al., 2017).

As duas principais espécies de percevejo barriga-verde que causam danos econômicos são *Dichelops furcatus* (Fabricius, 1775) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (PANIZZI et al., 2000). Segundo Grazia (1978), a distribuição geográfica estimada para *D. melacanthus* compreende 13 estados brasileiros situados nas cinco diferentes regiões do país, enquanto que para *D. furcatus* a distribuição é mais restrita às áreas subtropicais, como a região Sul do Brasil.

As espécies *D. melacanthus* e *D. furcatus* são morfologicamente semelhantes, ambas possuindo a parte dorsal do corpo marrom, e a ventral verde quando vivos e em época reprodutiva (GRAZIA, 1978; PANIZZI et al., 2015). As principais características morfológicas das espécies de *Dichelops* são cabeça com jugas agudas, ângulos umerais na forma de espinhos, tamanho do inseto variando de 9 a 12 mm (GRAZIA, 1978), rostró alcançando as coxas posteriores, e margens antero-laterais do pronoto serrilhadas. Adultos de *D. furcatus* são maiores comparados aos adultos de *D. melacanthus*, porém as diferenças mais marcantes para

o reconhecimento das espécies encontram-se nas genitálias de machos e fêmeas (GRAZIA, 1978).

No entanto, a correta identificação das espécies e definição atual de sua distribuição geográfica a partir de caracteres morfológicos ainda é difícil, principalmente em função da grande variabilidade encontrada nas características diagnósticas. Com a expansão recente da fronteira agrícola para o cerrado e considerando o hábito polífago de *Dichelops* spp., pode-se ter ocorrido a dispersão de populações para regiões onde anteriormente não eram encontradas. Em alguns casos, como nos percevejos barriga-verde *Dichelops* spp., problemas de identificação e até mesmo a delimitação das espécies ainda são questões em aberto.

Considerando que métodos morfológicos podem ser de difícil interpretação em muitos casos, a taxonomia integrativa propõe abordagens e uso de informações de diferentes áreas do conhecimento, como morfologia, marcadores moleculares, genética de populações, filogeografia e filogenética para resolução de problemas taxonômicos (SCHLICK-STEINER et al., 2010). A taxonomia integrativa é, portanto, uma ferramenta de grande importância no estudo de caracterização e delimitação de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

Este trabalho representa a primeira abordagem integrativa para problemas taxonômicos envolvendo espécies pragas de Pentatomidae. Além da importância econômica e do impacto direto que os resultados obtidos terão nas cadeias produtivas a que *Dichelops* spp. estão associadas, estas espécies apresentam grande potencial para estudos futuros sobre aspectos da história de vida dos pentatomídeos em geral. Estudos recentes têm ressaltado a importância desse tipo de abordagem para compreensão da dinâmica da condição de praga desses insetos e na consequente escolha de estratégias de controle e manejo (i.e. CESARI et al., 2017; SOARES et al., 2018).

Os objetivos deste trabalho incluíram (a) estudar a diversidade morfológica de *Dichelops* spp. associadas à plantas cultivadas no Brasil, (b) testar a identificação das espécies com base na variação do tamanho e forma de partes do corpo (cabeça, escutelo e pronoto), utilizando métodos de morfometria linear (tradicional) e morfometria geométrica, testando a hipótese de existir sobreposição na variação observada intraespecificamente; e (c) a partir de ferramentas moleculares e filogeográficas, investigar a demografia, a diversidade genética atual e estabelecer, de forma comparada, o padrão de distribuição geográfico das duas espécies, bem como a estrutura espacial e genética das populações de *D. melacanthus* e *D. furcatus* no Brasil.

REFERÊNCIAS

- CESARI, M.; MAISTRELLO, L.; PIEMONTESE, L.; BONINI, R.; DIOLI, P.; LEE, W.; GUIDETTI, R. Genetic diversity of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in the invaded territories of Europe and its patterns of diffusion in Italy. **Biol. Invas.**, p. 1-20, 2017.
- CHOCOROSQUI, V.R. Bioecologia de *Dichelops (Diceraeus) melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), Danos e controle em Soja, Milho, e Trigo no Norte do Paraná. 160 p. **Tese** - (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, 2001.
- CHOCOROSQUI, V.R.; PANIZZI, A.R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotrop. Entomol.**, v.33, n.4, p.487-492, 2004.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Percevejos e o sistema de produção soja-milho. **Circular técnica**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos/Embrapa Soja, ISSN: 1516-781X ; n.397, 98 p. 2017.
- GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas a cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 127 p., 1996.
- GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera: Pentatomidae, Pentatomini). Iheringia, **Série Zoológica**, v.53, p.3-119, 1978.
- SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Ann. Rev. Entomol.** 55, 421–438, 2010.
- SMANIOTTO, L.F. Biologia e interação com plantas associadas dos percevejos barriga-verde, *Dichelops furcatus* (F., 1775) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. 115p., 2015.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, 98, 7-17, 2015.
- PANIZZI, A.R. Entomofauna changes with soybean expansion in Brazil. In: Napompeth, B. (Ed.). **Proceedings World Soybean Research Conference**. Bangkok: Kasetsar University, 1997. p.166-168. 581p, 1997.

- PANIZZI, A. R.; McPHERSON, J. E.; JAMES, D. G.; JAHAVERY, M.; MCPHERSON, R. M. Economic importance of stink bugs (Pentatomidae), p. 421-474. *In* Schaefer C. W., and A. R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance, **CRC Press**, Boca Raton, FL., USA. 2000.
- PANIZZI, A.R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Invasive species into the U.S.A. and Neotropical species that might invade the U.S.A. **Am. Entomologist** 61, 223-233, 2015.
- PANIZZI, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; SMANIOTTO, L. F.; DA SILVA PEREIRA, P. R. V. Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo. Embrapa Trigo, **Ser. Documentos** 114, 40p., 2015.
- SOARES, P.L.; CORDEIRO, E. M.; SANTOS, F. N.; OMOTO, C.; CORREA, A. S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports** 8, article 2496, 2018.
- VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho. **Circular técnica**. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS 13 p., 2015.
- ZHANG, W.; RICKETTS, T. H.; KREMEN, C.; CARNEY, K.; SWINTON, S.M. Ecosystem services and dis-services to agriculture. **Ecol Econ.** 2007; 64: 253–260, 2007.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A família Pentatomidae

Membro da superfamília Pentatomoidea, a família Pentatomidae é uma das maiores dentro da subordem Heteroptera, com quase 5.000 espécies descritas em 900 gêneros (GRAZIA & SCHWERTNER, 2017; RIDER et al., 2018). Com 10 subfamílias reconhecidas, maioria de hábito fitófago, várias espécies são consideradas pragas agrícolas (PANIZZI, 2015; RIDER et al., 2018). As espécies da subfamília Asopinae possuem hábito predador, característica que surgiu secundariamente dentro da família (GRAZIA & SCHWERTNER, 2017).

As principais características dos pentatomídeos são antenas com cinco segmentos, escutelo grande e triangular não atingindo o ápice do abdômen e tibia, com pouco ou nenhum espinho, e corpo normalmente medindo mais que 7 mm (PANIZZI et al., 2012). Estes insetos apresentam cinco ecdises até a fase adulta, totalizando cinco estádios ninfais, não se dispersando tanto do local de oviposição, ou seja, cobrindo distâncias relativamente curtas (COSTA LIMA, 1940). Ninfas tardias e adultos iniciam a dispersão mesmo antes que a planta hospedeira atinja o estágio de maturação, dispersando para outros hospedeiros, sejam estas plantas cultivadas ou invasoras (CORRÊA-FERREIRA et al., 1999). Essa alternância de hospedeiras permite a sobrevivência do inseto no campo até o início de outro ciclo agrícola. Os percevejos pentatomídeos se alimentam de estruturas de plantas de diversas famílias, incluindo algumas de importância econômica como Brassicaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae e Poaceae, nas quais também podem completar seu ciclo de vida (SMANIOTTO & PANIZZI, 2015).

Mais de 100 espécies de percevejos pertencentes à família Pentatomidae são considerados pragas em plantas cultivadas pelo mundo (GRAZIA & SCHWERTNER, 2017). Recentemente têm crescido em importância dessas espécies devido ao potencial invasor (PANIZZI, 2015; McPHERSON 2018). Dentre elas, na região Neotropical, as espécies *Euschistus heros* (Fabricius), *Nezara viridula* (Linnaeus), *Edessa meditabunda* (Fabricius), *Piezodorus guildinii* (Westwood), *Dichelops furcatus* (Fabricius), *Dichelops melacanthus* (Dallas) e *Thyanta perditor* (Fabricius) ocorrem em diferentes plantas hospedeiras e em diferentes épocas do ano (PANIZZI et al., 2000; SMANIOTTO & PANIZZI, 2015).

2.2. *Dichelops furcatus*

O pentatomídeo *Dichelops furcatus* (Fabricius, 1775) possui o corpo pontuado de castanho ou negro, antenas e pernas da mesma cor do corpo, sendo que alguns apresentam reflexo vermelho-ferrugíneo nos três primeiros artigos das antenas, na parte posterior do pronoto, e no hemiélitro (GRAZIA, 1978). Conhecido como percevejo barriga-verde, *D. furcatus* ocorre no Brasil mais restrito às áreas subtropicais, na maioria das vezes, em regiões com temperaturas mais baixas, onde a temperatura anual varia de 14 a 22°, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (GRAZIA, 1978; PANIZZI, 2015). Também é registrado na Argentina, Paraguai e Uruguai. Nos dias atuais, a praga é considerada de importância econômica para culturas de inverno como trigo e aveia no sul do Brasil (PEREIRA et al., 2010), sendo também relatada em cultivos de soja em fim de ciclo e milho em estádios vegetativos iniciais (LINK & GRAZIA, 1987).

Além de atacar culturas de importância econômica, *D. furcatus* foi relatado utilizando outras espécies de plantas como hospedeiras, incluindo Canola (*Brassica napus* L.), Couve (*Brassica oleracea* L.), Rabanete (*Raphanus sativus* L.), e Girassol (*Helianthus annuus* L.) (FROTA & SANTOS, 2007; SMANIOTTO & PANIZZI, 2015).

2.3. *Dichelops melacanthus*

O pentatomídeo *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), também conhecido como percevejo barriga-verde, ocorre em diversos países da região Neotropical, incluindo Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai, Peru, Uruguai, e Venezuela (GRAZIA, 1978; SMANIOTTO, 2015). Segundo Grazia (1978), a espécie está distribuída abundantemente em 13 estados do Brasil, incluindo Amapá, Alagoas, Maranhão, Ceará, Tocantins, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

A ocorrência de *D. melacanthus* foi relatada pela primeira vez em lavouras no Brasil em 1993, em plântulas de milho no estado do Mato Grosso do Sul, causando murchamento devido ao ataque próximo ao colo da planta (ÁVILA; PANIZZI, 1995; CHOCOROSQUI, 2001). Ainda segundo estes autores, no mesmo ano constatou-se o ataque de *Dichelops* spp. também em plântulas de milho no estado do Paraná.

Segundo Panizzi (2015), as populações de *D. melacanthus* têm crescido drasticamente em cultivos de soja, milho e trigo no Brasil e Argentina, especialmente após a adoção do sistema de cultivo em plantio direto e múltiplos cultivos ao longo do ano, concentrando-se em áreas agrícolas com temperaturas mais elevadas, com temperatura anual variando de 20 a 24° C. Além

do ambiente com temperaturas favoráveis, os percevejos encontram nos restos da cultura anteriormente plantada, sementes secas e vagens que servem como fonte de alimento, contribuindo para a sobrevivência dessa praga no ambiente (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004).

De acordo com Smaniotto & Panizzi (2015), *D. melacanthus* pode também sobreviver e reproduzir em hospedeiros alternativos entre safras, sendo registrado em plantas de Trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.), Crotalária (*Crotalaria lanceolata* E. Mey.) e Anileira (*Indigofera hirsuta* L.), dentre outras nas quais é registrada a incidência do inseto.

2.4. Taxonomia de *D. furcatus* e *D. melacanthus*

Os percevejos do gênero *Dichelops* apresentam cabeça com jugas agudas, ângulos umerais na forma de espinhos, podendo ser longos ou arredondados, tamanho do inseto variando de 9 a 12 mm, rostrando alcançando as coxas posteriores, margens antero-laterais do pronoto serrilhadas e abdôme de coloração verde predominante (GRAZIA, 1978). Os ovos de *Dichelops* spp. possuem coloração verde clara, dispostos em grupos de variados tamanhos, e as ninfas apresentam coloração marrom acinzentada (CHOCOROSQUI, 2001).

As duas espécies encontradas em lavouras no Brasil *D. furcatus* apresenta grande semelhança morfológica com *D. melacanthus*, sendo separados por caracteres morfológicos qualitativos que incluem tamanho do inseto adulto e características de estruturas como cabeça, escutelo, pronoto e hemiélitro, além da morfologia das genitálias (GRAZIA, 1978). No entanto, as características somáticas são polimórficas e apresentam grande sobreposição entre as populações das duas espécies. Já as características de genitália, principalmente da cápsula genital dos machos (= pigóforo), são consideradas cruciais para a correta identificação das espécies.

Segundo Grazia (1978), uma das maneiras de reconhecer as duas espécies é pelo tamanho do indivíduo adulto, sendo que o de *D. furcatus* é maior que o de *D. melacanthus*, algo que nunca foi testado levando em consideração diferentes populações dessas espécies. Por sua vez, o pigóforo de *D. melacanthus* possui a região média da margem ventral bisinuada, e o processo do diafragma em forma de aba denteada. Já o pigóforo de *D. furcatus* possui a margem ventral retilínea em toda sua extensão ou apenas levemente sinuada no meio, e processo do diafragma em forma de tubérculo situado no fundo da câmara genital, muitas vezes encobertos pelos parâmeros. Em indivíduos fêmeas, os seguintes caracteres são utilizados para discriminar

as espécies: para *D. melacanthus*, os laterotergitos 8 são sub-agudos ou agudos na extremidade, enquanto que para *D. furcatus* são agudos ou aguçados na extremidade. Os gonocoxitos 8 são menos inflados que em *D. furcatus*, no qual dobram-se em direção dorsal formando um arco se observado em vista lateral (GRAZIA, 1978).

2.5. Danos e importância econômica do percevejo barriga-verde (*Dichelops* spp.)

O impacto econômico dos percevejos barriga-verde (*Dichelops* spp.) ocorre com mais frequência e importância nos sistemas de cultivo soja-milho, sendo também frequente em cultivos de cereais no Sul do Brasil, como trigo, aveia-preta, triticale e sorgo (CÔRREA-FERREIRA et al., 2017). Os danos ocorrem tanto por ninfas, como por indivíduos adultos, que se alimentam inserindo seus estiletes nos diferentes tecidos das plantas, ocasionando perda de fluídos, injeção de enzimas digestivas que danificam os tecidos, deformação de estruturas reprodutivas, e predisposição à colonização de organismos patogênicos e decompositores (SMANIOTTO & PANIZZI, 2015). Além do ambiente com alimentação em abundância e temperaturas favoráveis dos agroecossistemas, em sistemas de plantio direto, esses percevejos encontram nos restos da cultura da soja, colhida anteriormente à semeadura do milho, sementes secas e vagens que servem como fonte de alimento, bem como outras plantas hospedeiras que oferecem recursos alimentares e servem como ponte-verde no período de entressafra, contribuindo para a sobrevivência dessas pragas no ambiente (SMANIOTTO & PANIZZI, 2015).

No milho, as injúrias do percevejo barriga-verde são decorrentes da penetração dos estiletes e da sucção de seiva da base do colmo das plantas jovens, que, associadas à injeção de secreção salivares tóxicas, causam deformações e morte dos tecidos vegetais (PANIZZI et al, 2009). Esse problema ocorre na fase inicial e até no máximo vinte e cinco dias após a germinação, momento no qual a planta apresenta crescimento reduzido, pontuações e faixas cloróticas que podem evoluir e prejudicar a abertura normal das folhas, que podem ficar com aspecto “encharutado”, ou ainda ocasionar a morte do cartucho central da planta. Em casos mais extremos pode ocorrer a produção de perfilhos improdutivos e até a morte de plantas (ÁVILA; PANIZZI, 1995). O milho é mais suscetível aos danos causados por percevejos nos primeiros dias após a emergência das plantas, provavelmente por ser nesta fase que se define o potencial produtivo da cultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Apesar dos percevejos barriga-verde estarem presentes nas lavouras de soja desde a fase cotiledonar, podem não causar danos a esta planta. No entanto, é observado crescimento acentuado das populações no final do ciclo da cultura, próximo ao período de maturação das plantas (CÔRREA-FERREIRA et al., 2017), sendo necessária atenção em sistemas de produção soja-milho, nos quais após a colheita da soja ocorre a semeadura do milho, hospedeiro preferencial da praga.

2.6. Caracterização morfológica e uso de métodos morfométricos

Estudos morfológicos e morfométricos desempenham papel importante no estudo dos insetos, sendo primordiais para estudos taxonômicos, descrição de novas espécies e estágios imaturos (por ex. GRAZIA & FREY-DA-SILVA, 2001; BERNARDES et al., 2006), informações que também podem ser utilizadas em chaves de identificação (ANDRADE, 2014). Por sua vez, a morfometria auxilia em estudos de distinção entre espécies, estudos comparativos de morfologia dos insetos (LEMOS et al., 2005), na distinção de caracteres ligados ao dimorfismo sexual e na influência de aspectos ligados à sazonalidade sobre a morfologia das espécies (CARLESSI et al., 1999; FERREIRA et al., 2006).

Além disso, a morfometria geométrica combina as informações de forma dos organismos, e quando associadas à dados de biologia molecular, seja em filogenias moleculares, análises baseadas em genealogias a partir de informações de marcadores moleculares, efeitos de hibridização na assimetria dos organismos (KLINGENBERG et al., 2001; KLINGENBERG et al., 2010; KLINGENBERG, 2011), permitem quantificar as variações entre os indivíduos, trazendo inferências relevantes no estudo de indivíduos e populações (KLINGENBERG et al., 2002).

2.7. Marcadores mitocondriais

Os insetos são a forma de vida mais abundante na terra e devido ao elevado número de espécies existentes, a taxonomia e classificação a partir de dados morfológicos torna-se uma tarefa altamente dependente de especialistas e recursos (JALALI et al., 2015). Neste contexto, a disponibilidade das ferramentas moleculares levaram ao uso crescente destas na identificação de espécies pelo mundo, especialmente as de difícil reconhecimento morfológico (CÔRREA et al., 2013).

O uso de ferramentas moleculares baseadas no genoma mitocondrial, que vem sendo altamente empregado em estudos de identificação de espécies, permite não só a caracterização genética das populações, mas também avaliar a conformidade das características que tradicionalmente são utilizadas para identificar as espécies. O DNA mitocondrial é sugerido como marcador em estudos envolvendo animais devido à falta de recombinação e à neutralidade, sendo capaz de refletir a história e ancestralidade das espécies (HICKERSON et al., 2010). Em animais, o gene citocromo c oxidase subunidade I, de herança mitocondrial, é conhecido como sendo variável dentro dos genomas e seu uso é sugerido para identificação molecular destes organismos (SIMON et al., 1994), além de servir como um auxílio prático e ágil na identificação de espécies crípticas ou irmãs, formas imaturas dos insetos, sendo útil também na identificação de novas espécies (HERBERT et al., 2003).

2.8. Filogeografia, demografia e estrutura populacional

O termo filogeografia abrange a análise filogenética de dados de um determinado organismo no contexto da distribuição geográfica, além de ser uma ferramenta útil para testar hipóteses quanto à relação entre fenômenos geográficos, distribuição de espécies e mecanismos de especiação (AVISE et al., 1987; HICKERSON et al., 2010).

A análise de dados mitocondriais a nível de espécie é fundamental para estudos em filogeografia, uma vez que a partir de fragmentos de um gene mitocondrial, é possível conhecer a origem e ocorrência das espécies, parâmetros de história de vida, bem como relações de ancestralidade entre populações ou indivíduos (EMERSON et al., 2011). A partir do conhecimento das linhagens geográficas e localização geográfica de uma determinada espécie, torna-se possível entender os fatores que interferem na sua distribuição (HICKERSON et al., 2010). Além disso, a demografia populacional, que engloba aspectos de diversidade e fluxo gênico, permite inferir se as populações estudadas estão em expansão, ou seja, com alta taxa de polimorfismos de baixa frequência, ou em retração, com baixa taxa de polimorfismos (AVISE et al., 2000).

Em estudos de genética de populações, o uso do genoma mitocondrial é adequado devido ao alto grau de polimorfismo existente entre as sequências, e rápida evolução, sendo úteis nos estudos de variabilidade intraespecífica (RAMALHO et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.L.B. Aspectos biológicos, morfometria e técnica de criação de *Abaris basistriata* Chaudoir, 1873 e *Selenophorus seriatoporus* Putzeys, 1878 (Coleoptera: Carabidae). **Tese** (Doutorado em Agronomia/Entomologia Agrícola)- Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 66p., 2014.
- ÁVILA, C.J.; PANIZZI, A. R. Occurrence and damage by *Dichelops (Neodichelops) melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. **An. Soc. Entomol. Brasil** 24: 193-194, 1995.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18, 489–522, 1987.
- AVISE, J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. **Harvard University Press**, Cambridge, 2000.
- BERNARDES, J. L.C.; GRAZIA, J.; BARCELLOS, A. New species of *Neotibilis* Grazia & Barcellos (Hemiptera: Pentatomidae: Pentatomini). **Neotrop. Entomol.** 35(3):344-348, 2006.
- CARLESSI, L.R.G.; CORSEUIL, E.; SALVADORI, J.R. Aspectos biológicos e morfométricos de *Collaria scenica* (Stal) (Hemiptera: Miridae) em trigo. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 28(1):65-73, 1999.
- CÔRREA, A.S.; OLIVEIRA, L.O.; BRAGA, L.S.; GUEDES, R.N.C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. **Insect Sci.** 20, p. 263-270, 2013.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa Soja, Circular Técnica, 24, 45p., 1999.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. **Percevejos e o sistema de produção soja-milho**. Circular técnica. Londrina: Embrapa Soja, Documentos/Embrapa Soja, ISSN: 1516-781X ; n.397, 98 p. 2017.
- COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil: Hemípteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. t. 2. 351 p. (Série Didática, 3), 1940.
- CHOCOROSQUI, V.R. **Bioecologia de *Dichelops (Diceraeus) melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), Danos e controle em Soja, Milho, e Trigo no Norte do**

Paraná. 160 p. Tese - (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, 2001.

CHOCOROSQUI, V.R.; PANIZZI, A.R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotrop. Entomol.**, v.33, n.4, p.487-492, 2004.

EMERSON, B. C.; CICCONARDI, F.; PIETRO, P.; SHAW, P. J. A. Phylogeny, Phylogeography and Phylobetadiversity and the molecular analysis of biological communities. **Phyl. Comm. Ecol.**, 2391–2402, 2011.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: Fancelli, a. L.; Dourado Neto, d. (Ed.). **Produção de milho.** Guaíba: Agropecuária, p. 21-54, 2000.

FERREIRA, P. S. F.; PIRES, E. M.; GUEDES, R. N. C.; MENDES, M.; COELHO, L. A. Seasonal abundance and sexual variation in morphometric traits of *Oxelytrum discicolle* (Brulle, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in a Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, Campinas, v.6, n.2, p.1-4, 2006.

FROTA, R.T.; SANTOS, R.S.S. Pentatomídeos associados a cultivos de girassol no Noroeste do estado do Rio Grande do Sul e ação de *Euschistus heros* (Fabricius, 1791) (Hemiptera: Pentatomidae) em aquênios. **Rev Biotemas** 20:65–71, 2007.

GRAZIA, J. & FREY-SILVA, A. Descrição dos imaturos de *Loxa deducta* Walker e *Pallantia macunaíma* Grazia (Heteroptera: Pentatomidae) em Ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. **Neot. Entomol.** 30(1):73-80, 2001.

GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera: Pentatomidae, Pentatomini). Iheringia, **Série Zoológica**, v.53, p.3-119, 1978.

GRAZIA, J.; SCHWERTNER, C. F. Stink bug phylogeny classification, biology and reproductive behaviour. In: **Stink Bugs: Biorational Control Based on Communication Processes**, Cokl, A., Borges, M. CRC Press., 226-246, 2017.

HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**, 270, 313–321, 2003.

HICKERSON, M. J., CARSTENS, B. C., CAVENDER-BARES, J., CRANDALL, K. A., GRAHAM, C. H., JOHNSON, J. B.; YODER, A. D. **Molecular Phylogenetics and**

- Evolution** Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phyl. Evol.*, 54(1), 291–301. 2010.
- JALALI, S. K., OJHA, R., & VENKATESAN, T. DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects, **New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management**, 13–23, 2015.
- KLINGENBERG, C.P.; BADYAEV, A.V.; SOWRY, S.M.; BECKWITH, N.J. Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. **American Naturalist**, 157, 11–23, 2001.
- KLINGENBERG, C.P.; BARLUENGA, M.; MEYER, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. **Evolution**, 56, 1909–1920, 2002.
- KLINGENBERG, C.P.; GIDASZEWSKI, N.A. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data. **Systematic Biology**, 59, 245–261, 2010.
- KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Mol. Ecol. Resources** 11: 353-357, 2011.
- LEMOES, W.P.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Morphology of female reproductive tract of the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on different diets. **Braz. Arch. Biol. Techn.** 48(1):129-138, 2005.
- LINK, D.; GRAZIA, J. Pentatomídeos da região central do Rio Grande do Sul. **An Soc Entomol Brasil** 16:115–129, 1987.
- McPHERSON, J.E. Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomoidea): Biology, Higher Systematics, Semiochemistry, and Management. **CRC Press**, 2018.
- PANIZZI, A. R.; McPHERSON, J. E.; JAMES, D. G.; JAHAVERY, M.; MCPHERSON, R. M. Economic importance of stink bugs (Pentatomidae), p. 421-474. *In* Schaefer C. W., and A. R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance, **CRC Press**, Boca Raton, FL., USA. 2000.
- PANIZZI, A.R.; BUENO, A.F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. **Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas**. Brasília: EMBRAPA. Cap.5. p.335-420, 2012.

- PANIZZI, A.R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Invasive species into the U.S.A. and Neotropical species that might invade the U.S.A. **Am. Entomologist** 61, 223-233, 2015.
- PEREIRA, P.R.V.S.; SALVADORI, J.R.; LAU, D. Cereais de inverno: Principais insetos-pragas. In: Santos, H.P., Fontanelli, R.S., Spera, S.T. (eds) **Sistemas de produção para cereais de inverno sob plantio direto no Sul do Brasil**. Embrapa Trigo, Passo Fundo, pp 225–253, 2010.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na Agropecuária**. UFLA, Lavras - MG, 5ª ed. p. 565. 2012.
- RIDER, D.A.; SCHWERTNER, C. F.; VILÍMOVÁ, J.; KMENT, P.; THOMAS D. B. Higher systematics of the Pentatomoidea. In: McPherson J, ed. **Biology of Invasive Stink bugs and related species**. Boca Raton, CRC Press, p. 25-200, 2018.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; AND FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences, and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann Entomol Soc Am** 87:651-701, 1994.
- SMANIOTTO, L.F. Biologia e interação com plantas associadas dos percevejos barriga-verde, *Dichelops furcatus* (F., 1775) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. 115p., 2015.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, 98, 7-17, 2015.

3. MORFOMETRIA COMPARADA DE *Dichelops* spp. (HEMIPTERA: HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

RESUMO

A classificação e identificação dos insetos é geralmente baseada em caracteres morfológicos. Atualmente, métodos morfométricos têm sido amplamente utilizados com sucesso na comparação e delimitação de espécies para variados grupos de insetos. Os percevejos *Dichelops furcatus* e *Dichelops melacanthus* são morfológicamente semelhantes, as principais diferenças utilizadas no reconhecimento das espécies encontram-se nas genitálias de machos e fêmeas, tornando a correta identificação dos adultos ainda difícil para não especialistas. Devido à condição de praga de *D. furcatus* e *D. melacanthus*, ocorrência simpátrica e elevado crescimento populacional em cultivos agrícolas no Brasil, o número de estudos sobre essas espécies têm crescido nos últimos anos. É observada grande variação na morfologia dessas espécies, trazendo em questão a correta identificação das mesmas. Neste trabalho, propomos uma abordagem integrativa utilizando morfometria linear e geométrica a fim de testar a delimitação entre *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Foram utilizadas fotografias de alta resolução das cabeças, escutelos e pronotos de indivíduos de populações das duas espécies. Foram feitas análises estatísticas a partir da forma (morfometria geométrica) e de medidas lineares (morfometria linear) das estruturas cabeça, escutelo e pronoto. Os resultados de morfometria geométrica mostraram que as formas da cabeça, escutelo e pronoto se sobrepõem entre as espécies, sendo este método ineficiente na identificação das mesmas. Já a morfometria linear mostrou-se eficiente em delimitar as espécies a partir da análise multivariada discriminante. Os parâmetros comprimento do escutelo, largura máxima do pronoto e comprimento abdominal são considerados como variáveis determinantes na separação entre *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

Palavras-chave: Morfometria; *Dichelops* spp.; Taxonomia; Pentatomidae

ABSTRACT

Insect classification and identification is usually based on morphological characters. Currently, morphometric methods have been widely used to compare and delimitate species for several groups of insects. The green-belly stink bugs *Dichelops furcatus* and *Dichelops melacanthus* are morphologically similar, and the differences used for its recognition are found in male and female genitalia, making adults' identification still hard for non-specialists. Due to *D. furcatus* and *D. melacanthus* pest status, sympatric occurrence and high population growth in agricultural crops in Brazil, the number of studies on these species has been increasing in the last few years. A great variation in the morphology of these species is observed, bringing into question the species delimitation. In this work, we propose an integrative approach, using traditional and geometric morphometrics in order to test the delimitation between *D. furcatus* and *D. melacanthus*. High resolution photographs of the heads, scutellum and pronotum of individuals from populations of both species were used. Statistical analysis was performed using shape analysis (geometric morphometrics), and using linear measurements of the head, scutellum and pronotum structures

(traditional morphometrics). The results of geometric morphometrics showed that head, scutellum and pronotum shapes strongly overlap among species, making this method inefficient in their identification. Traditional morphometrics was efficient in delimiting the species using discriminant multivariate analysis. The parameters scutellum length, maximum width of the pronotum and abdominal length are considered determinant variables in separating *D. furcatus* and *D. melacanthus*.

Keywords: Morphometrics; *Dichelops* spp.; Taxonomy; Pentatomidae

3.1. INTRODUÇÃO

A classificação e identificação dos insetos é tradicionalmente baseada em descrições morfológicas. Métodos morfométricos têm se mostrado cada vez mais comuns e eficientes na delimitação de espécies morfológicamente semelhantes e de difícil reconhecimento, assim como na descrição de novas espécies para diferentes grupos de insetos (MUTANEN & PRETORIUS, 2007; FERNÁNDEZ-ALDEA et al., 2014; MARINHO et al., 2017; DE-LA-MORA et al., 2018; AVENDAÑO et al., 2018).

Os percevejos do gênero *Dichelops* spp. são morfológicamente semelhantes, reconhecidos por possuírem cabeça com jugas agudas, ângulos umerais na forma de espinhos, tamanho do inseto variando de 9 a 12 mm, rostro alcançando as coxas posteriores, e margens antero-laterais do pronoto serrilhadas (GRAZIA, 1978). Porém, as diferenças mais marcantes para o reconhecimento das espécies encontram-se nas genitálias de machos e fêmeas, acessíveis no caso dos machos apenas com a dissecação dos indivíduos. Nas fêmeas, as diferenças apontadas nas placas genitais das fêmeas são bastante sutis e variáveis. Assim, a correta identificação dos adultos ainda é difícil para não-especialistas.

Em indivíduos machos, o pigóforo de *D. melacanthus* possui a região média da margem ventral bisinuada (Figura 1a, 1c) e o processo do diafragma em forma de aba denteada (Figura 1e). Já o pigóforo de *D. furcatus* possui a margem ventral retilínea em toda sua extensão (Figura 1b, 1d) ou apenas levemente sinuada no meio e processo do diafragma em forma de tubérculo (Figura 1f), situado no fundo da taça genital, muitas vezes encobertos pelos parâmeros (GRAZIA, 1978). Em indivíduos fêmeas (Figura 2), os seguintes caracteres são utilizados para discriminar as espécies: em *D. melacanthus*, os laterotergitos 8 são sub-agudos ou agudos na extremidade, em *D. furcatus* são agudos ou aguçados na extremidade. Os gonocoxitos 8 são menos inflados que em *D. furcatus*, no qual dobram-se em direção dorsal formando um arco se observado em vista lateral (GRAZIA, 1978).

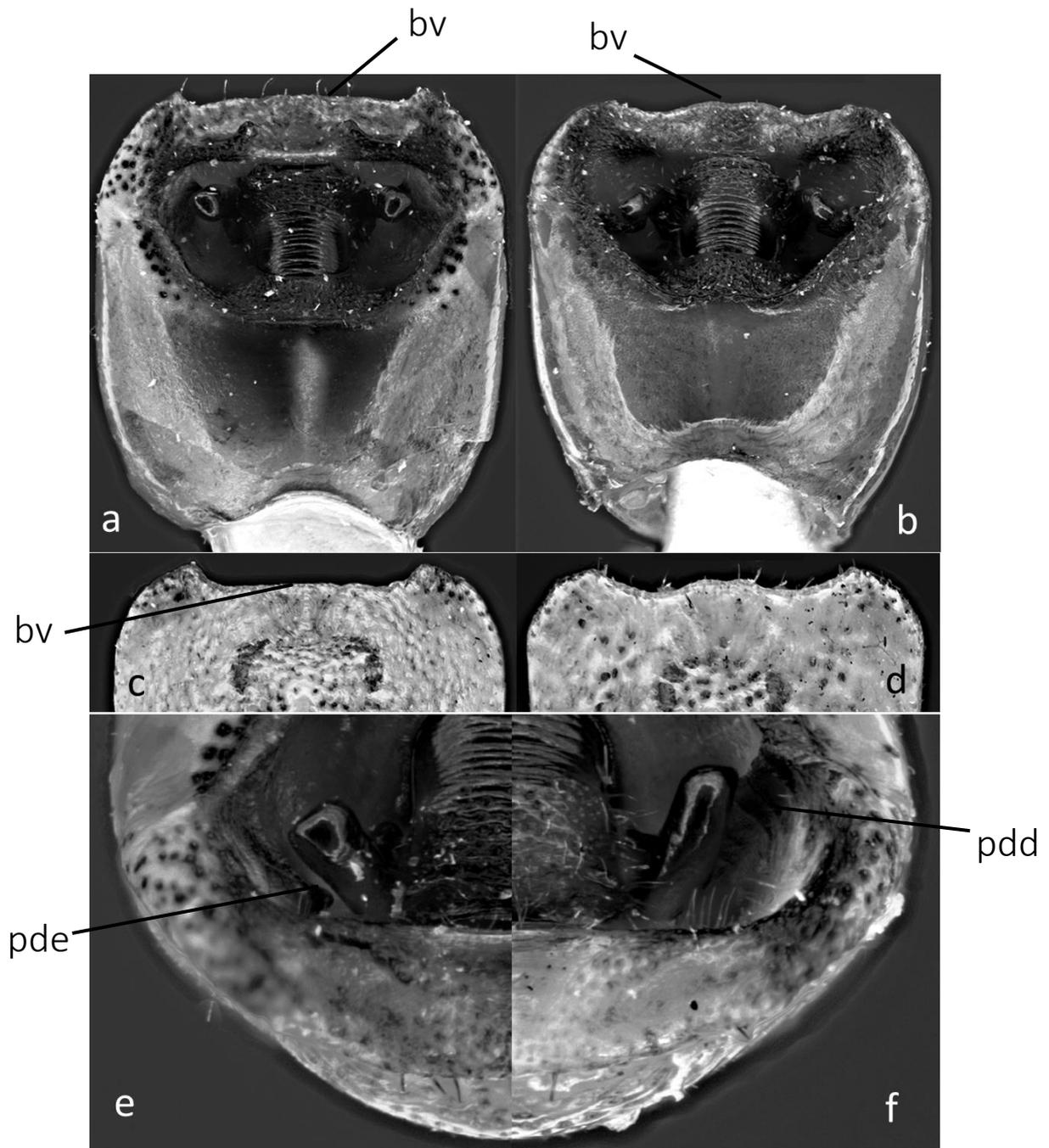


Figura 1. Cápsula genital dos machos de *Dichelops furcatus* (a, c, e) e *D. melacanthus* (b, d, f). a,b – vista dorsal; c,d – vista ventral da região apical; e,f – colagem da vista posterior (bv = bordo ventral; pdd = processo do diafragma em carena denteada; pde = processo do diafragma em espinho).

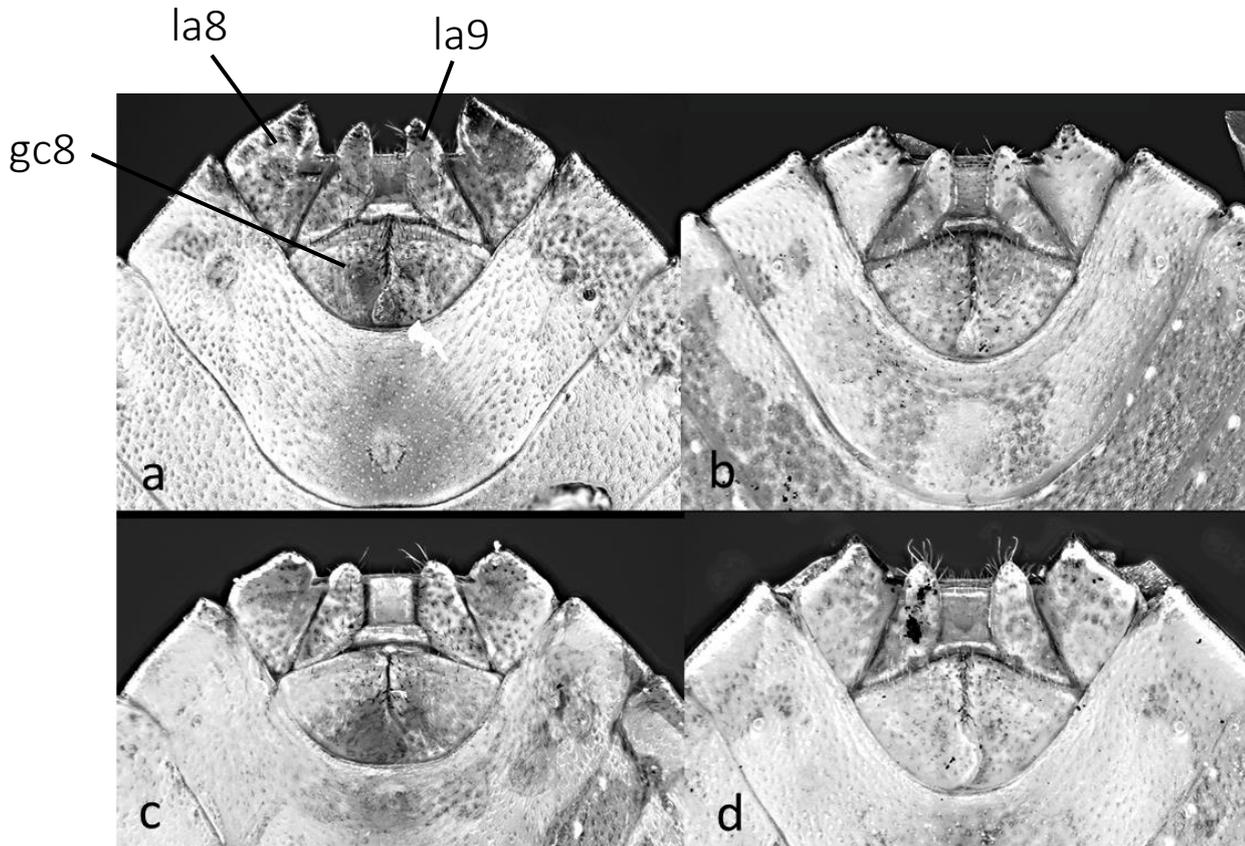


Figura 2. Placas genitais das fêmeas, *Dichelops furcatus* (a,c) e *D. melacanthus* (b, d), demonstrando a variação no desenvolvimento dos la8 e la9 (legenda: gc8 = gonocoxitos 8; la8 = laterotergitos 8; la9 = laterotergitos 9).

Atualmente, um maior número de estudos de *D. furcatus* e *D. melacanthus* vêm sendo publicados devido à condição de praga, ocorrência simpátrica e grande crescimento populacional em cultivos agrícolas de algumas regiões no Brasil (SMANIOTTO & PANIZZI, 2015). Boletins técnicos e informações provenientes de monitoramento de percevejos em diferentes regiões do país sugerem a identificação das espécies por caracteres ligados à cor e forma do espinho do pronoto, e cor do corpo (CORRÊA-FERREIRA et al., 2017). Porém, tais características, avaliadas de forma qualitativas, são extremamente variáveis dentro das espécies. GRAZIA (1978) indicou que indivíduos de *Dichelops furcatus* são maiores quando comparados à *Dichelops melacanthus*, porém esta informação nunca foi testada de forma quantitativa levando em consideração diferentes populações dessas espécies. Outros trabalhos sugerem a identificação das espécies baseando-se em levantamentos de ocorrência em lavouras de soja, sendo *D. furcatus* apontado como predominante nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e *D. melacanthus* como predominante a na metade norte do Estado do Paraná e demais regiões do Brasil (GRAZIA, 1978; PANIZZI, 2015).

Dados recentes utilizando os marcadores COI e 16s suportam que *D. furcatus* e *D. melacanthus* representam duas espécies distintas (Moraes, dados não publicados; Capítulo 2 desta dissertação). No entanto, observando indivíduos adultos de diferentes populações ao

longo de toda a distribuição das duas espécies, é possível perceber que os caracteres morfológicos utilizados para identificação são extremamente variáveis e em muitos casos por vezes se sobrepõe. Além disso, foi registrada recentemente na literatura a ocorrência de *D. furcatus* mais ao norte do Brasil (MAGGIO, 2017), o que sugere uma recente expansão da espécie onde anteriormente não era relatada.

Considerando a dificuldade na identificação entre *D. furcatus* e *D. melacanthus* e o recente aumento na incidência dessas espécies como pragas primárias em cultivos de soja, milho e outros cereais nas diferentes regiões do Brasil, propomos uma abordagem que integra métodos de morfometria linear e geométrica para auxiliar na identificação das duas espécies. O objetivo principal deste trabalho foi estudar a diversidade morfológica de *Dichelops* spp. associadas à plantas cultivadas no Brasil e testar métodos quantitativos, simples e mais eficiente possível, para identificação das espécies. Utilizando morfometria linear e morfometria geométrica, os objetivos específicos incluíram: (a) testar a identificação das espécies com base na variação do tamanho e forma de diferentes estruturas do corpo (cabeça, escutelo e pronoto), (b) testar a hipótese de sobreposição na variação morfológica observada intraespecificamente. Para isso, foram utilizados indivíduos provenientes de diferentes populações coletadas no Brasil.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostragem de indivíduos

Foram estudados 138 indivíduos de *Dichelops* spp. coletados em lavouras de 16 diferentes localidades no Brasil (38 indivíduos de *D. furcatus* e 100 indivíduos de *D. melacanthus*). As espécies foram identificadas a partir de caracteres morfológicos descritos por Grazia (1978), e confirmados por identificação molecular, como parte do capítulo 2 deste trabalho.

Os indivíduos de cada população foram individualizados e armazenados em tubos Eppendorf de 1,5mL em etanol 99% logo que coletados em campo, posteriormente armazenados em freezer a -20 °C para que fossem mantidas a qualidade e integridade do DNA dos indivíduos, além de evitar contaminações. As populações foram etiquetadas de acordo com o hospedeiro, local, data e coordenadas geográficas da respectiva coleta. Um mapa de distribuição para cada espécie foi construído utilizando o software Quantum Gis 2.18 (QGIS Development Team) (Figura 3).



Figura 3. Mapa de distribuição das populações de (a) *D. furcatus* e (b) *D. melacanthus* coletados no Brasil e Colômbia.

3.2.2. Obtenção dos dados morfométricos

Para testar a delimitação das espécies através de caracteres morfológicos, foram extraídas e montadas em triângulo, as cabeças e os pronotos dos 138 indivíduos adultos estudados. As demais estruturas (mesotórax, metatórax e abdomen) de cada indivíduo foram mantidas juntas e montadas em triângulo, de forma que o escutelo e o abdomen fossem visualizados em vista dorsal. Após fotografadas, o conjunto dessas estruturas foram mantidas para o álcool 99% para estudos que envolvem extração do DNA.

Cada estrutura morfológica foi posicionada paralelamente ao plano focal. Foram feitas imagens com focos subsequentes, automaticamente compiladas, gerando uma fotografia de alta resolução de cada estrutura. Todas as fotografias foram feitas utilizando câmera digital Leica DFC450 acoplada à estereomicroscópio Leica M205C e software LAS V4.5, disponíveis no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), no Departamento de Entomologia e Acarologia da USP/ESALQ.

As estruturas morfológicas de cada indivíduo foram medidas utilizando métodos de morfometria tradicional (linear) e geométrica (landmarks) a partir das fotografias (FERNANDEZ-ALDEA et al., 2014; AVENDAÑO et al., 2018).

Os seguintes parâmetros foram utilizados para as análises de morfometria tradicional (linear): largura do escutelo (LE), comprimento do escutelo (CE), comprimento do abdomen (CAB), largura máxima do pronoto (LMP), comprimento do pronoto (CP), largura na base do pronoto (LBP), comprimento máximo do pronoto (CMP), largura da cabeça (LC), distância interocular (DI), comprimento das jugas adiante dos olhos (CJAO), comprimento das

jugas aos ocelos (CCoce) e comprimento total (CCoce+CP+CAB) (CT). Todas as medidas estão expressas em milímetros (Figura 4).

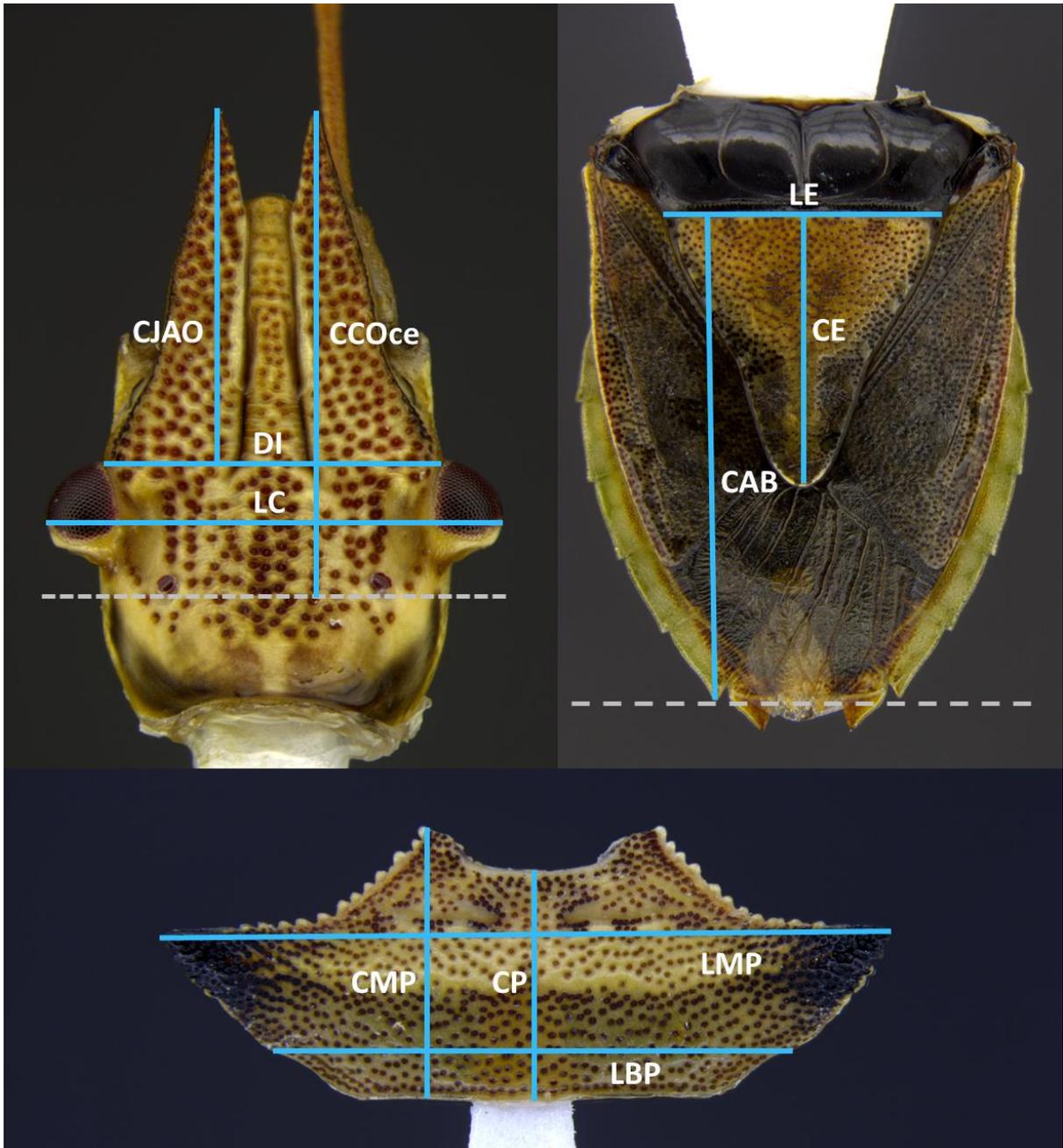


Figura 4. Medidas lineares para (A) cabeça, (B) escutelo e (C) pronoto de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

Para as análises de morfometria geométrica, que utiliza estatística para avaliar a variação nas formas dos indivíduos, foram digitalizados marcos anatômicos homólogos (*landmarks*) (Figura 5) para cada estrutura estudada, utilizando os softwares tpsUtil64 (ROHLF, 2017A) e tpsDig2 (ROHLF, 2017B).

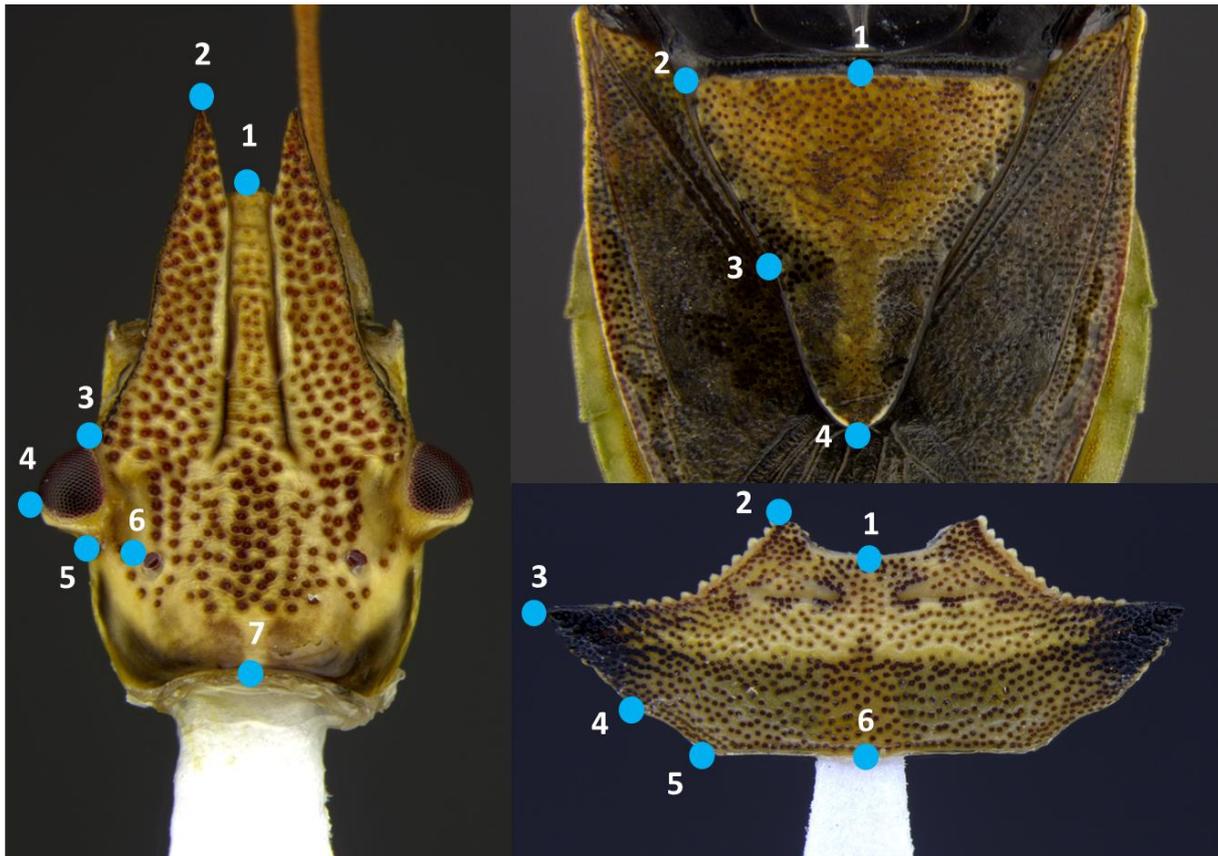


Figura 5. Posição dos landmarks digitalizados para (A) cabeça, (B) escutelo e (C) pronoto.

3.2.3. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas da morfometria linear, indivíduos com dados de medidas incompletos foram removidos das análises, de forma que os dados finais incluíram 31 indivíduos de *Dichelops furcatus* (♀ 15; ♂ 16) e 84 indivíduos de *Dichelops melacanthus* (♀ 40; ♂ 44). Todos os dados foram log-transformados a fim de se adequarem à normalidade, sendo também um pressuposto estatístico para análise multivariada. Dimorfismo interespecífico, intraespecífico, e sexual foram testados por análise de variância multifatorial (ANOVA multifatorial). Para identificar os parâmetros mais adequados para distinguir espécies, foi utilizada análise discriminante com variáveis canônicas (DFA) (STATSOFT, 2013). Todos os testes foram realizados utilizando $\alpha = 0,05$ no software STATISTICA 8 (STATSOFT, 2013).

Para as análises de morfometria geométrica, um arquivo TPS contendo todas as imagens de cada estrutura (31 indivíduos de *Dichelops furcatus* e 87 indivíduos de *Dichelops melacanthus*) foi criado utilizando o software tpsUtil (ROHLF, 2017B) e os landmarks foram digitalizados utilizando o software tpsDig2 (ROHLF 2017A). Todos os marcos anatômicos (*landmarks*)

foram transformados em coordenadas cartesianas (x, y), e as distâncias correspondentes às escalas de cada fotografia inseridas no mesmo arquivo.

As configurações de marcos anatômicos foram alinhadas utilizando o método da sobreposição de Procrustes, que elimina efeitos de transposição, rotação e escala, restando apenas diferenças de forma entre os marcos anatômicos analisados. Este ajuste dá menos peso para observações que estão distantes da forma média, fazendo com que a análise seja mais robusta contra a influência de ‘outliers’ (KLINGENBERG, 2011). Além disso, este método remove toda a informação não relacionada à forma e inclui todos os pontos em um mesmo sistema de coordenadas. Diferenças entre as populações e espécies foram testadas utilizando ANOVA de Procrustes, e a análise discriminante de grupos múltiplos (DFA) foi aplicada no resultado do componente simétrico para examinar o grau de separação entre as espécies para cada estrutura, bem como análise de componente principal (PCA). Todas as análises geométricas foram feitas utilizando software MorphoJ (KLINGENBERG, 2011).

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Morfometria linear

As medidas lineares resultantes de *D. furcatus* e *D. melacanthus* estão resumidas na Tabela 1. A diferença das médias de todos os parâmetros não foram significativas para interação espécie-sexo (ANOVA multifatorial, $F= 1,11$; $P= 0,360$) e entre sexos (ANOVA multifatorial, $F= 1,24$; $P= 0,268$), mas foram significativas entre as espécies (ANOVA multifatorial, $F= 20,15$; $P<0,005$).

Tabela 1. Medidas lineares de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. LE, Largura do escutelo; CE, Comprimento do escutelo; CAB, Comprimento do abdome; LMP, Largura máxima do pronoto; CP, comprimento do pronoto; LBP, Largura na base do pronoto; CMP, Comprimento máximo do pronoto; LC, Largura da cabeça; DI, Distância interocular; CJAO, Comprimento das jugas adianta dos olhos; CCoce, Comprimento das jugas aos ocelos; e CT, Comprimento total (em mm).

<i>D. furcatus</i> (n=31)												
Medida	Fêmeas (n=15)				Machos (n=16)				Total (n=31)			
	Média	SD	Min.	Máx.	Média	SD	Min.	Máx.	Média	SD	Min.	Máx.
LE	3,8	0,18	3,46	4,15	3,75	0,13	3,52	4	3,77	0,16	3,46	4,15
CE	3,87	0,19	3,54	4,34	3,83	0,13	3,59	4,08	3,85	0,16	3,54	4,34
CAB	6,63	0,27	6,13	7,04	6,83	0,35	6,17	7,37	6,73	0,32	6,13	7,37
LMP	7,46	0,56	6,56	8,66	7,04	0,46	6,33	7,76	7,25	0,55	6,33	8,66
CP	2,32	0,17	1,97	2,66	2,25	0,14	1,97	2,55	2,28	0,16	1,97	2,66
LBP	5,42	0,37	4,59	6,14	5,14	0,29	4,53	5,65	5,28	0,35	4,53	6,14
CMP	2,7	0,19	2,32	3,09	2,64	0,15	2,29	2,91	2,67	0,17	2,29	3,09
LC	2,21	0,77	2,08	2,35	2,16	0,07	2,07	2,3	2,18	0,07	2,07	2,35
DI	1,68	0,06	1,56	1,8	1,63	0,05	1,55	1,74	1,66	0,06	1,55	1,8
CJAO	1,65	0,05	1,56	1,75	1,62	0,08	1,5	1,77	1,63	0,07	1,5	1,77
CCoce	2,37	0,06	2,25	2,48	2,31	0,07	2,21	2,43	2,34	0,07	2,21	2,48
CT	9,32	0,4	8,47	10,05	9,42	0,41	8,56	10,03	9,37	0,4	8,47	10,05

<i>D. melacanthus</i> (n=84)												
Medida	Fêmeas (n=40)				Machos (n=44)				Total (n=84)			
	Média	SD	Min.	Máx.	Média	SD	Min.	Máx.	Média	SD	Min.	Máx.
LE	3.52	0.23	3.08	4.02	3.38	0.21	2.87	3.91	3.45	0.23	2.87	4.02
CE	3.44	0.24	2.9	3.85	3.27	0.24	2.25	3.67	3.35	0.25	2.25	3.85
CAB	5.91	0.5	4.92	7.16	5.63	0.54	3.55	6.76	5.77	0.53	3.55	7.16
LMP	7.28	0.71	6.02	8.46	7.06	0.65	5.84	8.17	7.16	0.68	5.84	8.46
CP	2.12	0.17	1.7	2.4	2.04	0.12	1.81	2.29	2.08	0.15	1.7	2.4
LBP	4.97	0.36	4.35	5.76	4.81	0.29	4.21	5.7	4.89	0.33	4.21	5.76
CMP	2.5	0.19	2.05	2.82	2.41	0.15	2.1	2.7	2.45	0.17	2.05	2.82
LC	2.07	0.08	1.95	2.24	2.03	0.05	1.88	2.14	2.05	0.07	1.88	2.24
DI	1.56	0.07	1.4	1.73	1.52	0.05	1.39	1.64	1.54	0.06	1.39	1.73
CJAO	1.56	0.07	1.43	1.65	1.54	0.08	1.37	1.71	1.55	0.07	1.37	1.71
CCoce	2.21	0.15	1.93	2.9	2.17	0.1	1.94	2.37	2.19	0.13	1.93	2.9
CT	8.42	0.63	7.18	9.74	8.07	0.55	6.4	9.24	8.24	0.61	6.4	9.74

Os Testes de Tukey HSD para comparação múltipla de médias ($\alpha = 0,05$) demonstraram diferenças significativas [$F(11,101) = 20,147$; $P < 0,05$] para todos os parâmetros (Figura 6), com exceção da largura máxima do pronoto (LMP), que se sobrepõe entre as espécies.

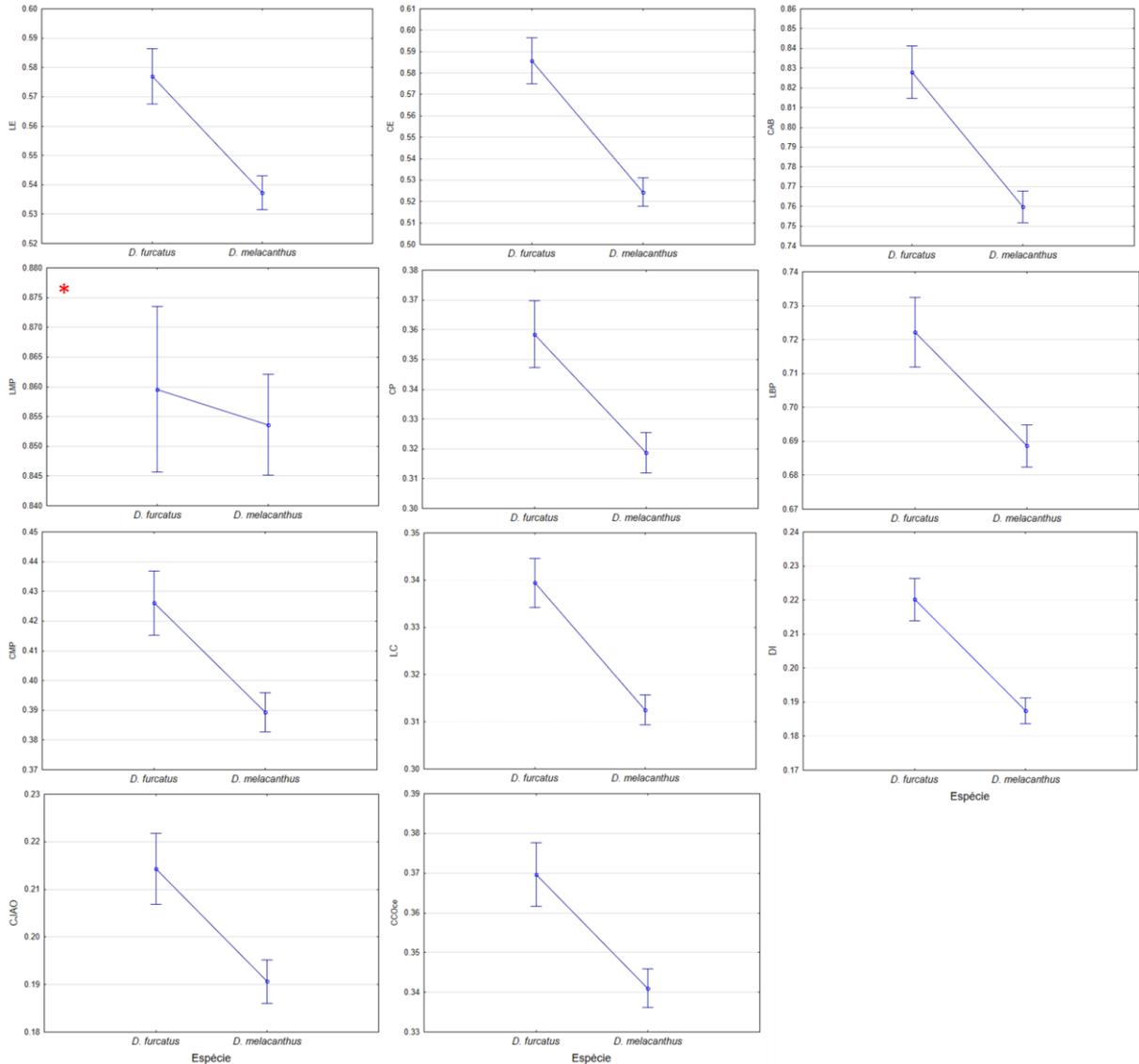


Figura 6. Teste de Tukey para comparação múltipla de médias das medidas lineares LE, CE, CAB, LMP, CP, LBP, CMP, LC, DI, CJAQ e CCOce para *D. furcatus* e *D. melacanthus*. *= Médias não significativas entre espécies.

A análise discriminante incluindo todos parâmetros medidos (cabeça, escutelo e pronoto) de *D. furcatus* e *D. melacanthus* foi significativa (Wilks' Lambda= 0,334; F (11,103) = 18,665; P=0,000; Figura 7) Os resultados suportam que essa análise é eficiente em identificar as duas espécies através de morfometria linear.

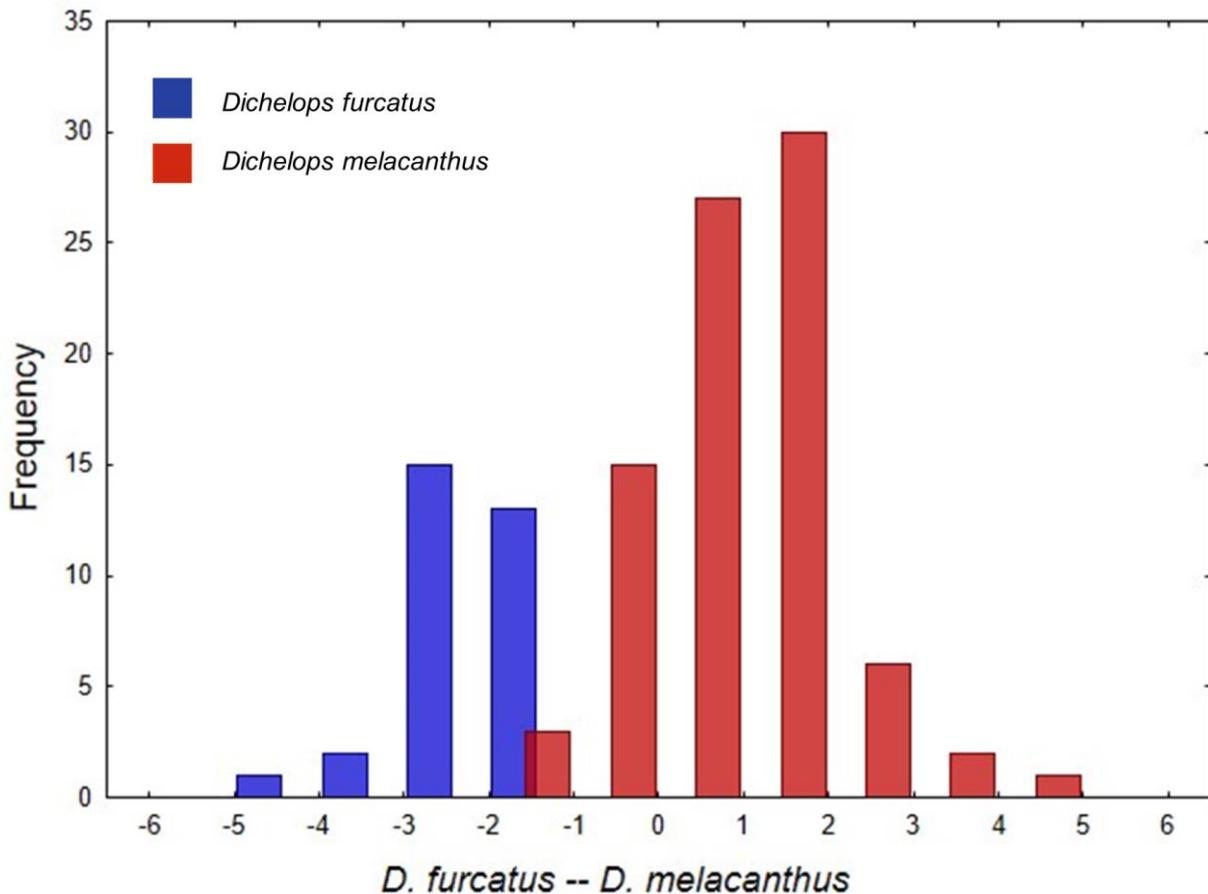


Figura 7. Diagrama de análise de função discriminante com variáveis canônicas, com base nas medidas lineares correspondentes para parâmetros totais de cabeça, escutelo e pronoto (D) de 31 indivíduos de *D. furcatus* e 84 indivíduos de *D. melacanthus*.

Tendo em vista os resultados da análise discriminante com todos os parâmetros, verificou-se que as seguintes medidas lineares foram significativas: comprimento do escutelo (CE) [Wilks' Lambda= 0,362; $F(1,103) = 8,881$; $P=0,003$], largura máxima do pronoto (LMP) [Wilks' Lambda= 0,451; $F(1,103) = 36,355$; $P=0,000$] e comprimento abdominal (CAB) [Wilks' Lambda= 0,350; $F(1,103) = 5,037$; $P=0,026$]. Estes parâmetros são sugeridos para correta identificação e delimitação das espécies *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

3.1.2. Morfometria geométrica

A partir do diagrama de mudança de forma para o componente principal 1 (Figura 8) fica claro a grande variação na forma encontrada pelos marcos anatômicos para cabeça, escutelo e pronoto de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Esta variação encontrada reflete a variação morfológica presente nas populações ao longo da distribuição geográfica.

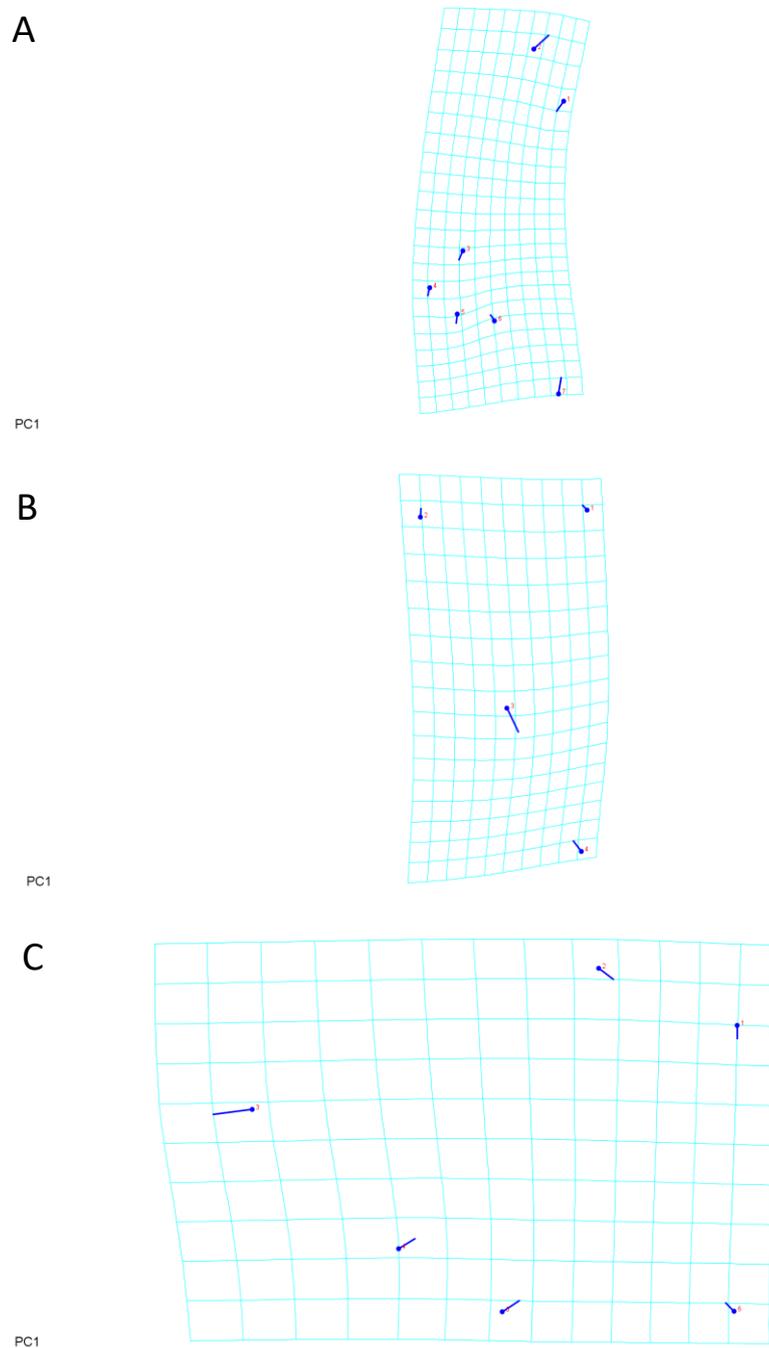


Figura 8. Diagrama da mudança de forma no componente principal 1 para cabeça (A), escutelo (B) e pronoto (C) de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Os pontos representam a forma original e as linhas indicam a mudança de forma na direção positiva ao longo do eixo.

A análise discriminante com base nas formas médias correspondentes (Figura 9) demonstra uma alta sobreposição na forma entre as espécies. Esses dados confirmam que a

variação encontrada na forma das estruturas de ambas as espécies torna esse método pouco eficiente a delimitação e identificação de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

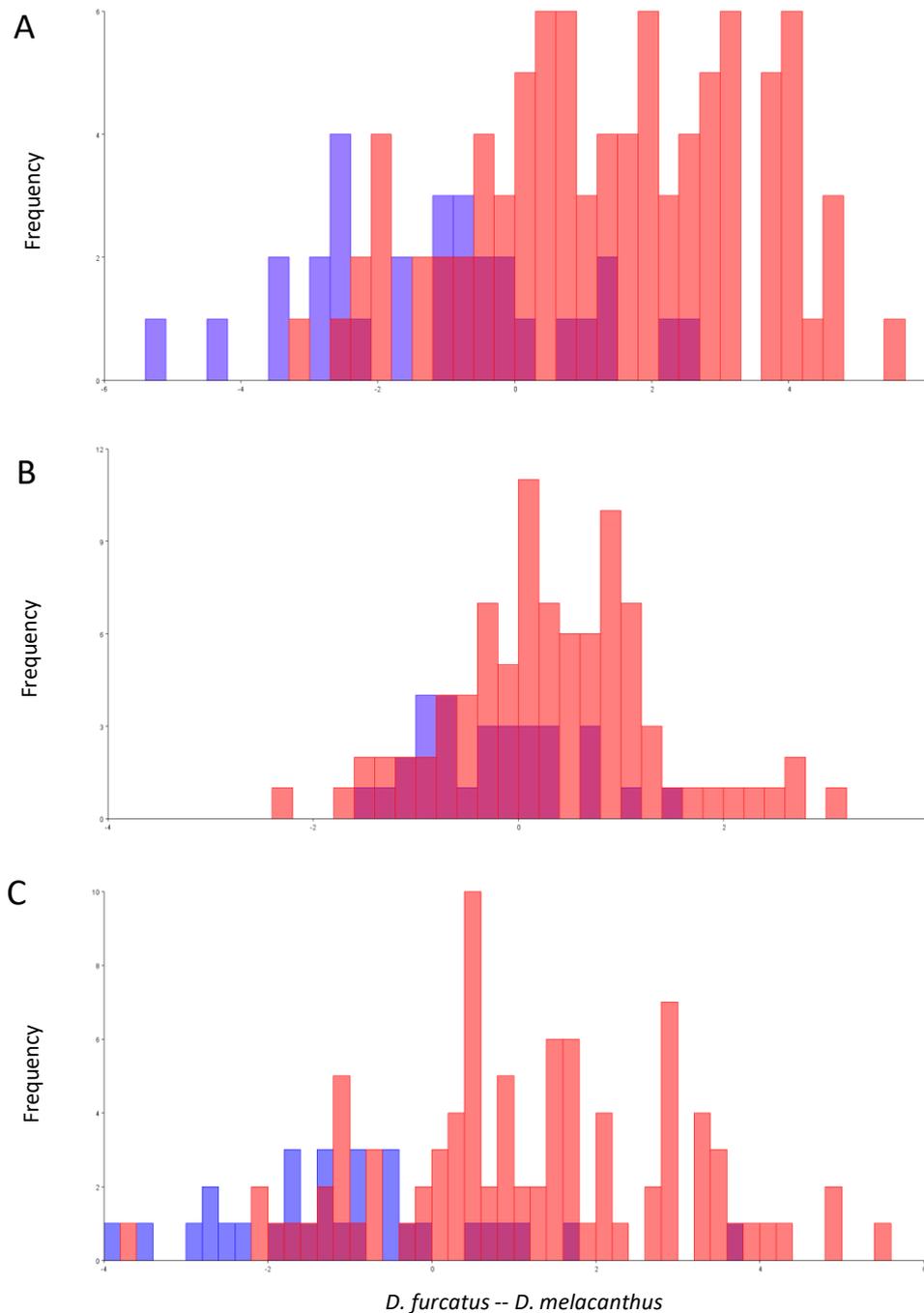


Figura 9. Diagrama de análise de função discriminante após o procedimento de validação cruzada, com base na variável discriminante de forma e formas médias correspondentes para cabeça (A), escutelo (B) e pronoto (C) de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Azul= *D. furcatus* e Vermelho= *D. melacanthus*.

Assim como descrito para a análise discriminante para os dados de forma, a análise de componente principal a partir dos marcos anatômicos correspondentes demonstra alta sobreposição nas formas de cabeça, escutelo e pronoto entre as espécies *D. furcatus* e *D. melacanthus*. É possível observar a partir das elipses de confiança (95%), que esta análise não é eficiente em determinar a espécie de interesse somente com base na forma (Figura 10).

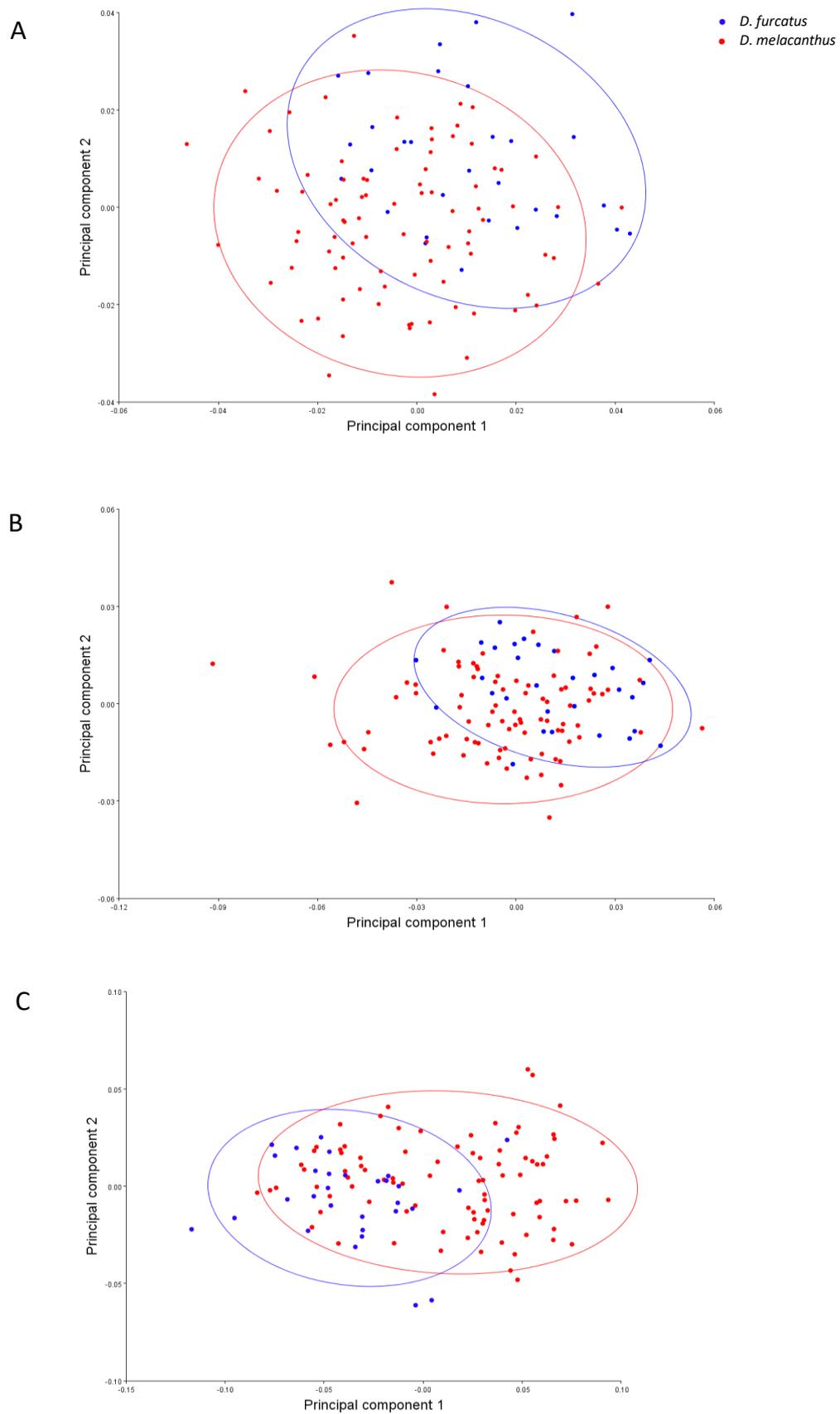


Figura 10. Análise de componente principal (PCA) para a variável forma de cabeça (A), escutelo (B) e pronoto (C) de indivíduos de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

3.2. DISCUSSÃO

A análise multivariada discriminante, utilizando medidas lineares, é um método estatístico que pode ser utilizado na delimitação dos percevejos do gênero *Dichelops*. Este método é usualmente aplicado com sucesso em estudos de identificação, sistemática, e em estudos envolvendo problemas taxonômicos para vários outros grupos de insetos.

Para mosca-das-frutas do gênero *Anastrepha*, ARAUJO et al. (1998) demonstram a eficiência da análise discriminante em distinguir 4 espécies utilizando medidas lineares. Já para percevejos do gênero *Cyrtomenus*, AVENDAÑO et al. (2018) utilizaram abordagem que integra a análise discriminante para dados lineares e geométricos, permitindo a identificação de caracteres capazes de delimitar as espécies *C. mirabilis* e *C. bergi*. Em estudos para a família Pentatomidae, FERNÁNDEZ-ALDEA et al. (2014) utilizaram metodologia similar, porém na descrição de duas novas espécies do gênero *Oenopiella*.

GRAZIA (1978) demonstrou que os limites de variação de medidas lineares para machos e fêmeas de *D. furcatus* e *D. melacanthus* não se sobrepõem. No entanto, a autora comparou indivíduos das duas espécies coletados em uma mesma localidade, não levando em consideração diferentes populações. Por apresentarem distribuição simpátrica em grande parte do território brasileiro, a variação interpopulacional dessas espécies não deve ser ignorada ao se estabelecer um método eficiente de identificação. Além disso, dados recentes da literatura indicam a ocorrência de expansão na distribuição de *Dichelops furcatus*, sendo encontradas em regiões onde anteriormente não ocorria.

Por sua vez, a morfometria geométrica não foi eficiente na separação das espécies. Este método é amplamente utilizado em trabalhos de taxonomia e classificação. Novas espécies de parasitóides da família Ichneumonidae foram descritos por SCHWARZFELD & SPERLING (2014), com base em morfometria linear, geométrica e marcadores mitocondriais. MARINHO et al. (2017) utilizaram a morfometria geométrica aliada à ferramenta molecular na descrição de novas espécies morfologicamente semelhantes do gênero *Doryctobracon*. Para a ordem Coleoptera, DE-LA-MORA et al. (2018) utilizaram a morfometria geométrica e ferramentas moleculares na delimitação de espécies da família Curculionidae associadas à plantas hospedeiras.

Ambas as espécies, *Dichelops furcatus* e *Dichelops melacanthus*, demonstraram muita variação intraespecífica na posição dos landmarks utilizados para descrever a forma da cabeça, pronoto e escutelo. Sendo assim, a forma dessas estruturas não permite diferenciar as duas espécies. Por sua vez, o método tradicional (linear) demonstrou-se eficiente na delimitação de

D. furcatus e *D. melacanthus*. A diferença entre os resultados dos dois métodos aqui utilizados pode ser explicada pela grande estruturação e diversidade genética encontrada nas populações de ambas as espécies (dados não publicados; Capítulo 2 desta dissertação). O tamanho como método diagnóstico na identificação das espécies sugere que mesmo com a variação interespecífica, ainda é possível separar *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Já a forma pode estar diretamente ligada à grande variação intraespecífica encontrada para ambas as espécies, e por essa razão, não ser um fator determinante na separação.

Outros trabalhos, como SOARES et al. (2018), ressaltam a expansão populacional de percevejos altamente relacionados à expansão da fronteira agrícola no Brasil. Dessa forma, estudos taxonômicos baseados em diferentes abordagens e tipos de dados podem auxiliar de forma efetiva na interpretação dos caracteres diagnósticos comumente encontrados nos indivíduos.

Métodos quantitativos multivariados para identificação podem ser usados principalmente em estudos envolvendo populações nas quais a ocorrência das espécies é simpátrica, conseqüentemente gera dúvidas na identificação dos indivíduos. Este trabalho demonstra a importância do método quantitativo aliado à estatística multivariada, uma vez que as características usualmente utilizadas para identificação dos percevejos barriga-verde são variáveis e de difícil interpretação.

3.3. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a morfometria linear, a partir de uma análise discriminante multivariada, é eficiente na correta identificação dos percevejos barriga-verde, *Dichelops furcatus* e *Dichelops melacanthus*. Os parâmetros comprimento do escutelo, largura máxima do pronoto e comprimento abdominal são considerados como variáveis determinantes na separação das espécies. Por sua vez, a morfometria geométrica não foi eficiente na delimitação dessas espécies, levando-se em conta a grande variação intrapopulacional e intraespecífica encontradas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.L.; NASCIMENTO, F. M.; ZUCCHI, R.A. Utilização da análise discriminante em estudos taxonômicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae). *Sci. Agric.*, vol.55, no.1, p.105-110., 1998.
- AVENDAÑO, J. M.; BARÃO, K. R.; GRAZIA, J.; SCHWERTNER, C. F. Synonymy of two important crop pests of burrower bugs, *Cyrtomenus mirabilis* and *C. bergi* (Hemiptera: Cydnidae), based in a multi-source approach, *Zootaxa* v, 4504, n, 4, p, 489–500, 2018.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Percevejos e o sistema de produção soja-milho. **Circular técnica**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos/Embrapa Soja, ISSN: 1516-781X ; n.397, 98 p. 2017.
- DE-LA-MORA, M.; PIÑERO, D.; OYAMA, K.; FARRELL, B.; MAGALLÓN, S.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. Molecular Phylogenetics and Evolution Evolution of *Trichobaris* (Curculionidae) in relation to host plants: Geometric morphometrics, phylogeny and phylogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 124, n. January, p. 37–49, 2018.
- FERNÁNDEZ-ALDEA, A. A. F.; BARÃO, K. R.; GRAZIA, J.; FERRARI, A. An Integrative Approach to the Taxonomy of *Oenopiella* Bergroth (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae: Pentatominae: Carpocorini) with the Description of Two New Species from Argentina and Southern Brazil, **Annals of the Entomological Society of America**, 107(2):364-381, 2014.
- GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera: Pentatomidae, Pentatomini), Iheringia, **Série Zoológica**, v.53, p,3-119, 1978.
- KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Mol. Ecol. Resources** 11: 353-357, 2011.
- MAGGIO, D.H. Distribuição potencial e impacto das mudanças climáticas nas espécies pragas de Pentatomidae (Hemiptera) da região Neotropical. **Dissertação**. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, UNIFESP, 95p., 2017.
- MARINHO, C. F.; CÔNSOLI, F. L.; PENTEADO-DIAS, A. M.; ZUCCHI, R. A. Description of two new species closely related to *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), based on morphometric and molecular analyses. **Zootaxa**, v. 4353, n. 3, p. 467–484, 2017.
- MUTANEN, M.; PRETORIUS, E. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: A comparison of moth genitalia. **Systematic Entomology**, v. 32, n. 2, p. 371–386, 2007.

- PANIZZZI, A.R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Invasive species into the U.S.A. and Neotropical species that might invade the U.S.A. **Am. Entomologist** 61, 223-233, 2015.
- ROHLF, F.J. TpsDig, version 2.30. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2017a.
- ROHLF, F.J. TpsUtil64, version 1.74. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2017b.
- SCHWARZFELD, M.D.; SPERLING, F.A.H. Species delimitation using morphology, morphometrics, and molecules: definition of the *Ophion scutellaris* Thomson species group, with descriptions of six new species (Hymenoptera: Ichneumonidae). **ZooKeys** 462: 59–114, 2014.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, 98, 7-17, 2015.
- SOARES, P.L.; CORDEIRO, E. M.; SANTOS, F. N.; OMOTO, C.; CORREA, A. S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports** 8, article 2496, 2018.
- STATSOFT. Structural Equation Modeling, Statsoft Electronic Statistics Textbook, <http://www.statsoft.com/textbook/structural-equation-modeling/>, 2013.
- QGIS Development Team. QGIS User Guide, Release 2,18: QGIS Project, 2016.

4. DIVERSIDADE POPULACIONAL E FILOGEOGRAFIA DE *Dichelops furcatus* E *Dichelops melacanthus* NO BRASIL

RESUMO

O avanço da fronteira agrícola para o cerrado e a intensificação dos sistemas de cultivo no Brasil, desencadearam o crescimento de populações de insetos anteriormente considerados pragas secundárias. Neste contexto, o percevejo barriga-verde, *Dichelops* spp., tornou-se praga importante em lavouras de milho de segunda safra, em função dos danos significativos à cultura, sobretudo no início do desenvolvimento vegetativo. *Dichelops furcatus* parece se mostrar mais adaptado às regiões de clima subtropical, enquanto *Dichelops melacanthus* se mostra mais adaptado à climas tropicais. No entanto, estudos detalhados sobre a própria delimitação das espécies, a variação apresentada por elas, e sua relação com a estrutura populacional ao longo de toda a sua distribuição são escassos. Assim, utilizamos uma abordagem filogeográfica para (a) testar a separação das duas linhagens atualmente reconhecidas como *D. furcatus* e *D. melacanthus*; (b) estimar a diversidade genética e os parâmetros demográficos das populações estudadas; (c) descrever a estrutura populacional das duas espécies, em diferentes ecorregiões brasileiras; e (d) estimar o tempo de divergência inter- e intraespecífico de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. Utilizamos indivíduos de *D. furcatus* e *D. melacanthus* provenientes de populações de 18 locais do Brasil, e dois marcadores mitocondriais (COI e 16S). Os resultados indicam que as populações possuem alta diversidade genética, estão em expansão demográfica e são altamente estruturadas geograficamente. A relações genealógicas entre haplótipos sugerem que as populações são antigas e a presença de linhagens maternas dentro de cada espécie. A filogenia indica que *D. melacanthus* é uma linhagem mais antiga que *D. furcatus*. Para conclusões mais robustas sobre os eventos históricos e contemporâneos que moldaram as populações de *Dichelops* spp na América do Sul é necessário expandir a amostragem para regiões mais ao Norte do continente e aplicar marcadores moleculares nucleares que permitirão acessar um maior número de informações sobre os padrões filogeográficos das populações de *Dichelops* spp.

Palavras-chave: Filogeografia; Percevejo-barriga-verde; Gene mitocondrial; Demografia

ABSTRACT

Expansion of the agricultural frontier in Brazil and the intensification of crop systems have led to the increase of insect populations that were previously considered secondary pests. In this context, the green-belly stink bug, *Dichelops* spp. has become an important pest in maize cultivation, due to the significant damage to the crop, especially at the beginning of vegetative development. *Dichelops furcatus* appears to be more adapted to subtropical climate regions, while *Dichelops melacanthus* is more adapted to tropical climates. However, detailed studies on the species delimitation itself, the variation presented by them, and their relation to the population structure throughout its distribution are scarce. Thus, we use a phylogeographic approach to (a) test the separation of the two currently recognized lineages *D. furcatus* and *D. melacanthus*; (b) estimate the genetic

diversity and demographic parameters of the populations; (c) to describe the population structure of the two species, in different Brazilian ecoregions; and (d) to estimate the inter- and intraspecific divergence time of *D. furcatus* and *D. melacanthus*. We used populations of *D. furcatus* and *D. melacanthus* from 18 Brazilian sites and two mitochondrial markers (COI and 16S). The results indicate that populations have high genetic diversity, are in demographic expansion and are highly geographically structured. The genealogical relationships between haplotypes suggest that the populations are old and there is the presence of maternal lineages within each species. Phylogeny indicates that *D. melacanthus* is an older lineage than *D. furcatus*. For more robust conclusions about the historical and contemporary events that shaped *Dichelops* spp. populations in South America, it is necessary to expand the sampling to Northern regions of the continent and to apply nuclear molecular markers that will allow access to a greater number of information about the phylogeographic patterns of *Dichelops* spp. populations.

Keywords: Phylogeography; Green-belly stink bug; Mitochondrial genes; Demography

4.1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o avanço da fronteira agrícola para o cerrado e a crescente intensificação dos sistemas de cultivo, especialmente a expansão do plantio direto e da segunda safra de milho, desencadearam o crescimento de populações de insetos anteriormente considerados pragas secundárias (PANIZZI, 1997; SMANIOTTO & PANIZZI, 2015). Algumas espécies da família Pentatomidae vêm se destacando como importantes pragas em diversos cultivos na região Neotropical (PANIZZI, 2015).

Dentro do complexo de pentatomídeos-praga, o percevejo barriga-verde, *Dichelops* spp. (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) é considerado praga-chave em cultivos de milho no Brasil (VALICENTE, 2015). Estas espécies frequentemente são encontradas em áreas de milho, soja e trigo, devido ao cultivo sucessivo dessas culturas ao longo do ano (CHOCOROSQUI & PANIZZI, 2004). Estes percevejos tornaram-se praga importante em lavouras de milho segunda safra, em função dos danos significativos à cultura, sobretudo no início do desenvolvimento vegetativo, reduzindo o vigor e a população de plantas (GASSEN, 1996; CHOCOROSQUI, 2001; CORREA-FERREIRA et al., 2017).

De uma maneira geral, *D. furcatus* parece melhor adaptada às regiões com clima subtropical, enquanto *D. melacanthus* aos climas tropicais (GRAZIA, 1978; SMANIOTTO & PANIZZI, 2015). No entanto, a própria delimitação das espécies ainda carece de estudos mais detalhados, que incluam uma abordagem integrativa, utilizando diferentes conjuntos de dados para confirmar as hipóteses de GRAZIA (1978) para a definição das espécies *D. furcatus* e *D.*

melacanthus. As características somáticas são altamente polimórficas, com ampla plasticidade fenotípica, e apresentam grande sobreposição entre as populações.

Como consequência, a definição exata da atual distribuição geográfica das duas principais espécies e a definição de qual espécie predomina nas lavouras em diferentes regiões do Brasil são ainda questões em aberto. Com a expansão recente da fronteira agrícola para o cerrado e considerando o hábito polígrafo de *Dichelops* spp., a dispersão recente das populações para regiões onde não são comumente descritas pode ter ocorrido de forma rápida. Com exceção do efeito do fotoperíodo na morfologia de *D. melacanthus* (CHOCOROSQUI & PANIZZI, 2004), não se conhece nenhum tipo de dado sobre a variação apresentada por essas duas espécies e sua relação com a estrutura populacional ao longo de toda a sua distribuição.

O uso de ferramentas moleculares baseadas no genoma mitocondrial vem sendo altamente empregado em estudos de identificação de espécies (AVISE, 1987). Essas ferramentas permitem não só a caracterização genética das populações, mas também testar a conformidade das características que tradicionalmente são utilizadas para identificar as espécies. Nesse contexto, a filogeografia auxilia na compreensão da história evolutiva de espécies relacionadas, permitindo explorar sua genealogia e a distribuição geográfica das linhagens (AVISE, 2000). Neste trabalho nós estudamos a história evolutiva de *D. furcatus* e *D. melacanthus* nas principais regiões produtoras de cereais no Sul, Sudeste e Centroeste do Brasil utilizando marcadores mitocondriais. Nossos objetivos específicos foram: (a) testar a separação das duas linhagens atualmente reconhecidas com *D. furcatus* e *D. melacanthus*, e se existem linhagens a serem reconhecidas intraespecificamente; (b) estimar a diversidade genética e os parâmetros demográficos das populações estudadas; (c) descrever a estrutura populacional das duas espécies, em diferentes ecorregiões brasileiras; e (d) estimar o tempo de divergência inter- e intraespecífico de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostragem de populações e extração de DNA

Populações do percevejo barriga-verde, *D. furcatus* e *D. melachantus*, foram coletadas em 19 diferentes locais no Brasil, assim como as respectivas informações de planta hospedeira e coordenadas geográficas (Tabela 1). Os indivíduos de cada população foram individualizados e armazenados em tubos Eppendorf de 1,5mL em etanol 99% logo que coletados em campo, posteriormente armazenados em freezer a -20 °C para que fossem mantidas a qualidade e

integridade do DNA dos indivíduos, além de evitar contaminações. As populações foram etiquetadas de acordo com o hospedeiro, local, data e coordenadas geográficas da respectiva coleta.

Tabela 1. Local de amostragem de populações de *Dichelops* spp., código, espécie, hospedeiro, e coordenadas geográficas dos respectivos locais.

Local (Cidade/Estado)	Código	Espécie	Hospedeiro	Latitude	Longitude
Santa Maria, RS	RSSM	<i>D. furcatus</i>	Soja	29°43'38" S	53°33'38" O
Passo Fundo, RS	RSPF	<i>D. furcatus</i>	Canola	28°13'33" S	52°23'49" O
Passo Fundo, RS	RSLB	<i>D. furcatus</i>	Laboratório	28°13'33" S	52°23'49" O
Paranavaí, PR	PRPN	<i>D. melacanthus</i>	Soja	23°06'14" S	52°26'02" O
Itapetininga, SP	SPIT	<i>D. melacanthus</i>	Milho	23°31'09" S	48°02'45" O
Piracicaba, SP	SPPI	<i>D. melacanthus</i>	Soja/Milho	22°45'00" S	48°00'00" O
Pindorama, SP	SPPD	<i>D. melacanthus</i>	Trapoeraba	21°13'26" S	48°54'32" O
Salto, SP	SPSA	<i>D. melacanthus</i>	Soja	23°07'38" S	47°19'39" O
Capitólio, MG	MGCA	<i>D. melacanthus</i>	Soja	20°38'06" S	46°03'13" O
Florestal, MG	MGFL	<i>D. furcatus</i>	Soja	19°52'31" S	44°25'07" O
Florestal, MG	MGFL	<i>D. melacanthus</i>	Soja	19°52'31" S	44°25'07" O
Maracaju, MS	MSMA	<i>D. melacanthus</i>	Soja	21°38'28" S	55°06'31" O
Rondonópolis, MT	MTRD	<i>D. melacanthus</i>	Soja	16°32'13" S	54°38'36" O
Sinop, MT	MTSI	<i>D. melacanthus</i>	Soja	11°52'32" S	55°36'06" O
S. A. de Goiás, GO	GOLB	<i>D. melacanthus</i>	Laboratório	16°28'00" S	49°17'00" O
S. A. de Goiás, GO	GOST	<i>D. furcatus</i>	Arroz	16°28'00" S	49°17'00" O
Mineiros, GO	GOMI	<i>D. melacanthus</i>	Milheto/Tomate	17°27'18" S	52°35'59" O
Penedo, AL	ALPE	<i>D. melacanthus</i>	Mata	10°18'57" S	36°33'01" O
Tolima, Colômbia	COTO	<i>D. melacanthus</i>	Mata	4°16'33" N	74°54'18" O

Para a extração de DNA total dos indivíduos de cada população, foi extraído o tecido muscular da cavidade torácica, obtido com a remoção integral da perna esquerda, de forma que as estruturas do corpo do inseto, úteis na identificação morfológica e na morfometria, não fossem destruídas. Foi utilizado protocolo padrão de extração de DNA do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes da ESALQ/USP, que utiliza como base tampão CTAB para lise celular (DOYLE & DOYLE, 1987), remoção de proteína com proteinase K e lavagem com clorofórmio, adaptado para pentatomídeos. A verificação do DNA total das extrações foi feita utilizando gel de agarose 1% em eletroforese.

4.2.2. Amplificação dos genes COI e 16S e sequenciamento de Sanger

Para amplificação do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI), foram inicialmente utilizados os iniciadores C1-J-1751 (GGATCACCTGATATAGCATTTCCC) e TL2-N-3014 (TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA) (SIMON et al., 1994). Foram amplificados fragmentos de 1.263 pares de bases de 20 indivíduos de *D. furcatus* e *D. melacanthus*. As condições para reação da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em volume total de 25 µL, e por amostra os seguintes reagentes: 2,0 µL de dNTP; 2,0 µL de primer F; 2,0 µL de Primer R; 2,5 µL de Mg; 2,5 µL de Tampão; 0,3 µL de Taq Polimerase; 10,7 µL de Água Milli-Q; e 3 µL do DNA do indivíduo. Os ciclos de PCR serão nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por um minuto; 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C; anelamento a 58°C por 45seg; extensão a 72°C por 1min e 30 seg; e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para verificar a amplificação positiva, foi feita a corrida em eletroforese utilizando gel de agarose 1,5%, corados com SYBR life (LIFE TECHNOLOGIES).

Posteriormente, os produtos da amplificação que apresentaram alta qualidade foram purificados com as enzimas EXO (Exonuclease I) e FastAp (Thermosensitive Alkaline Phosphatase). As condições de purificação utilizaram ciclo de 37°C por 30 minutos, 80°C por 15 minutos em termociclador. O sequenciamento foi terceirizado no Laboratório de Biotecnologia Animal, no Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. As sequências foram alinhadas manualmente e analisadas pelo software Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corp., Ann Harbor, MI, USA), e a partir dos polimorfismos interespecíficos encontrados, foi desenhado um primer específico para o gênero *Dichelops*, nomeado de Dic-F (GRATAGTRGGATCAGCGATA) e Dic-R (GCTGATGTGAARTATGCTCGT) com intuito de otimizar as reações de PCR e o sequenciamento da região de interesse. Posteriormente, o primer específico foi testado nas amostras, e a amplificação feita para todos os indivíduos de cada população. Os resultados positivos de PCR foram verificados e purificados seguindo protocolo já descrito, enviados para sequenciamento e as sequências alinhadas e editadas manualmente para 701 pares de bases.

Além do gene COI, foi utilizado um segundo marcador mitocondrial, o gene 16S. Utilizando a reação de polimerase em cadeia, com os iniciadores específicos 16Sar (CGCCTGTTTAACAAAACAT) e 16Sbr (CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT), foram amplificados e sequenciados fragmentos para os indivíduos de todas as populações estudadas. Após sequenciamento, o material foi alinhado e editado, caso necessário, manualmente para

448 pares de bases utilizando o aplicativo Sequencher 4.1. Cada gene foi isoladamente alinhado utilizando a ferramenta ClustalW do aplicativo MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011).

4.2.3. Análises de diversidade, demografia e estrutura populacional

Para análises subsequentes, as populações foram avaliadas isoladamente ou agrupadas de acordo com ecoregiões brasileiras, definidas utilizando variáveis dos biomas e edafoclimáticas. Assim delimitamos três subgrupos para *D. melachantus* (Ecorregião 1= populações do sudeste presentes na transição dos biomas Mata-Atlântica e Cerrado; Ecorregião 2= População do Sul-Paraná e Centro-Oeste-MS com padrões agrícolas semelhantes; Ecorregião 3= Populações do Cerrado (Centro-oeste) com características edafoclimáticas semelhantes; e dois subgrupos para *D. furcatus* (Ecorregião 1= Sul do Brasil (Pampa); Ecorregião 2 = Cerrado). Para *D. melachantus*, as populações da Colômbia e Alagoas não foram agrupadas e utilizadas nas análises demográficas e de estrutura genética.

Para as análises de diversidade, foi utilizado o software DnaSP V5 (ROZAS, 2003), no qual foi calculado o número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd), a diversidade nucleotídica (π), bem como o número de sítios variáveis para os genes COI e 16S em ambas as espécies.

A partir do teste de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989), utilizando o software Arlequin (EXCOFFIER et al., 2005), foi feita a estimativa se as populações estão em expansão, ou seja, em pressão de seleção positiva, se as populações estão em equilíbrio, e ainda se as mutações encontradas entre as populações estão de acordo com a hipótese neutra da evolução molecular descrita por KIMURA (1989). Além disso, foi feito o teste F_s de Fu (FU, 1997) leva em consideração o fator temporal das mutações, classificando-as também como antigas ou recentes.

A análise de variância molecular (AMOVA) com foco em diferentes ecoregiões foi realizada utilizando o software Arlequin 3.5.1.2. (EXCOFFIER et al., 2005). Essa análise decompõe a variância total das frequências gênicas em componentes de variância associados a diferentes níveis de subdivisão na análise de variância (AMOVA). As ecoregiões foram agrupadas a partir de características morfoclimáticas e bióticas de cada local correspondente a cada população amostrada para cada espécie. A partir da variação genética dentro das populações foi possível indicar se existe ou não estruturação genética, e concluir se as populações das duas espécies são ou não similares entre si.

4.2.4. Inferências genealógicas e estimativa de tempo de divergência

As redes de haplótipos para os genes mitocondriais COI e 16S foram construídas a partir do método de median joining (BANDELT et al., 1999) utilizando o software PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (LEIGH & BRYANT, 2015).

A árvore Bayesiana dos haplótipos baseados nas sequências dos genes COI e 16S concatenados foi gerada utilizando software MrBayes 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo evolutivo previamente selecionado para a árvore foi o HKY+G+I, utilizando o MRMODELTEST (NYLANDER, 2004). Foi utilizado como outgroup a espécie *Eysarcoris annamita* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae: Pentatominae) (COI, acesso GenBank: LC209923; 16S, acesso GenBank: LC209957).

A estimativa de tempo de divergência entre *D. furcatus* e *D. melacanthus* (relógio molecular) foi feita utilizando as sequências concatenadas dos genes mitocondriais COI e 16S no software BEAST 4.1.8 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees; DRUMMOND et al., 2012). O modelo de substituição foi o mesmo utilizado na árvore Bayesiana gerada pelo MrBayes (HKY+G+I). Os modelos de relógio-molecular estrito para estimar a taxa de substituição nucleotídica, e os parâmetros de árvores coalescentes constantes foram implementados. Foi utilizado o relógio molecular para insetos (média=0.0177), correspondente a 3,54% de divergência por milhões de anos (PAPADOPOULOU et al., 2010). Foram realizadas três séries independentes por 150 milhões de gerações, sendo a amostragem feita a cada 1000 passos e descartando 20% das árvores (burn-in). O TRACER v.1.6 foi usado para determinar a convergência, medir o tamanho efetivo da amostra (ESS) e calcular a média e o intervalo de densidade posterior (DP) mais alto de 95% para o tempo de divergência. O tamanho efetivo da amostra (ESS) para todos os parâmetros excedeu 200. As corridas foram combinadas com o LogCombiner v.1.4.7.

4.3. RESULTADOS

Foram obtidas 35 sequências de COI e 15 sequências de 16S para *D. furcatus*, e 94 sequências de COI e 71 sequências de 16S para *D. melacanthus*. Como resultado 20 haplótipos para o gene COI e 7 haplótipos para o gene 16S compartilhados entre as populações de *D. furcatus*, enquanto que para populações de *D. melacanthus* foram encontrados 41 haplótipos para o gene COI, e 27 haplótipos para o gene 16S (Tabela 2).

Tabela 2. Código da população, ecorregião, número de haplótipos e frequência de haplótipos dos genes mitocondriais COI, 16S e COI-16S para populações de *D. furcatus* (negrito) e populações de *D. melacanthus* (itálico).

Código	Ecorregião	Frequência de haplótipos COI (n)	Frequência de haplótipos 16S (n)	Frequência de haplótipos COI-16S (n)
RSSM	Ecorregião 1	H1; H2(2); H4(4); H6; H8; H9; H18	H1(7); H6; H7	H1; H2; H3(4); H5; H7
RSPF	Ecorregião 1	H4(2); H10; H11; H12; H13; H14(2); H15	H1; H4	H3; H6
RSLB	Ecorregião 1	H4(2); H16; H17; H20	H5	H10
GOST	Ecorregião 2	H2; H3(5); H5(2); H7	H1, H2	H4; H9
MGFO	Ecorregião 2	H19	H3	H8
SPIT	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H22; H27; H28(3); H30(2); H31(2); H32</i>	<i>H8; H13; H14(4); H15; H16</i>	<i>H19(2); H21; H22; H23; H24; H25; H50</i>
SPPI	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H21(3); H22; H26; H41; H42; H43</i>	<i>H12; H21; H22(2); H23(3); H24; H25</i>	<i>H18; H30(2); H38; H39; H40; H41</i>
SPPD	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H21(2); H22(2); H23; H24; H25(2); H27; H29; H48</i>	<i>H8(3); H12; H16; H19; H20</i>	<i>H12; H14; H15; H16; H17(2)</i>
SPSA	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H21(2); H32; H38; H39; H40</i>	<i>H24(2); H28; H29; H30</i>	<i>H28; H35; H36; H37</i>
MGCA	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H21; H61</i>	<i>H8</i>	<i>H49</i>
MGFO	<i>Ecorregião 1</i>	<i>H55</i>	-	-
MSMA	<i>Ecorregião 2</i>	<i>H21(11); H31</i>	<i>H8; H15(7); H17</i>	<i>H11(7); H13; H26</i>
PRPN	<i>Ecorregião 2</i>	<i>H21(7); H26(3); H33; H34;</i>	<i>H22(2); H23(3); H24(3); H26; H27</i>	<i>H18(2); H20; H27; H28(3); H29; H30(2)</i>
MTRD	<i>Ecorregião 3</i>	<i>H21(2); H31; H35; H36; H37(3); H51; H52</i>	<i>H12; H15(2); H18; H19(4)</i>	<i>H31; H32; H33; H34(3); H51; H52</i>
MTSI	<i>Ecorregião 3</i>	<i>H21(3); H44(2); H45(2); H46; H47</i>	<i>H24(2); H31; H32; H33; H34</i>	<i>H28; H42; H43; H44; H45; H46</i>
GOLB	<i>Ecorregião 3</i>	<i>H56(2); H57; H58; H59</i>	<i>H11(5)</i>	<i>H54(2); H55; H56; H57</i>
GOMI	<i>Ecorregião 3</i>	<i>H21(3); H37; H53; H54</i>	<i>H12</i>	<i>H53</i>
ALPE	<i>Ecorregião 4</i>	<i>H60</i>	-	-
COTO	<i>Ecorregião 5</i>	<i>H49; H50</i>	<i>H9, H10</i>	<i>H47; H48</i>

*n= frequência do haplótipo.

De acordo com as análises de diversidade para as populações de *D. melacanthus*, foi observada alta diversidade nucleotídica e haplotípica nas ecorregiões 1 e 3 para o gene COI (Tabela 3). Para o gene 16S, a diversidade nucleotídica e haplotípica foi alta nas ecorregiões 1, 2 e 3. Ecorregiões 1 e 3 foram as mais diversas para os dois genes.

Para *D. furcatus* os maiores valores de diversidade nucleotídica foram encontrados na ecorregião 2 correspondente às populações localizadas no cerrado brasileiro (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética para *D. melacanthus*; tamanho da amostra, número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (hd), diversidade nucleotídica (π), e número de sítios variáveis para as ecorregiões; baseados em sequências dos genes COI e 16S.

Ecorregião	Tamanho da amostra	Número de haplótipos (H)	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)	# sítios polimórficos
COI					
Ecorregião 1	38	21	0,94	0,009	42
Ecorregião 2	24	5	0,43	0,006	15
Ecorregião 3	30	17	0,91	0,014	56
Ecorregião 5	2	2	1,00	0,004	3
16S					
Ecorregião 1	29	15	0,93	0,013	30
Ecorregião 2	19	8	0,83	0,009	10
Ecorregião 3	20	10	0,90	0,011	19
Ecorregião 5	2	2	1,00	0,002	1

Tabela 4. Parâmetros de diversidade genética para *D. furcatus*; tamanho da amostra, número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (hd), diversidade nucleotídica (π), e número de sítios variáveis para as ecorregiões; baseados em sequências dos genes COI e 16S.

Ecorregião	Tamanho da amostra	Número de haplótipos (H)	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)	# sítios polimórficos
COI					
Ecorregião 1	25	16	0,90	0,009	29
Ecorregião 2	10	5	0,75	0,015	23
16S					
Ecorregião 1	12	5	0,57	0,001	4
Ecorregião 2	3	3	1,00	0,070	5

Considerando os genes COI e 16S, os valores negativos encontrados nos testes de neutralidade de F_s de F_u para *D. melacanthus*, indicam expansão populacional ou seleção purificadora. As estatísticas do teste de neutralidade não concordaram entre si, sendo a estatística F_s de F_u significativa para todas as ecorregiões, enquanto que os valores D de Tajima não foram significativos (Tabela 5). No entanto, o teste F_s de F_u é mais efetivo em indicar eventos de expansão populacional comparado ao D de Tajima.

A análise de distribuição Mismatch resultou em um SSD não significativo ($P>0,05$) para as 3 ecorregiões no gene COI, o que indica expansão demográfica, concordando com os testes de neutralidade de Fu. Para o gene 16S, foi encontrado SSD não significativo para as ecorregiões 1 e 3, indicando também expansão demográfica (Tabela 5). O índice de Raggedness Harpending (Rag) não significativo ($P>0,05$) suporta o modelo de expansão espacial de populações de *D. melacanthus* para todas as ecorregiões (Tabela 5). Os valores de τ (tau) foram maiores para as ecorregiões 1 e 3 em ambos os genes, sugerindo que as populações nessas regiões são mais antigas (Tabela 5).

Tabela 5. Estatística dos testes de Neutralidade e análise de distribuição Mismatch para populações de *D. melacanthus* agrupadas em ecorregiões, com base nos genes mitocondriais COI e 16S ($P=0,01$).

Ecorregião	N	Tajima's D (Valor P)	Fs' Fu (Valor P)	τ (SD)	SSD (Valor P)	Rag (Valor P)
COI						
Ecorregião 1	38	-1.09 (0.13)	-25.08* (0.000)	7.01 (4.37-11.83)	0.002 (0.97)	0.002 (0.97)
Ecorregião 2	24	0.47 (0.70)	-25.56* (0.000)	3.00 (0.37-3.50)	0.14 (0.05)	0.43 (0.42)
Ecorregião 3	30	-0.96 (0.16)	-23.56* (0.000)	12.40 (5.07-16.34)	0.01 (0.47)	0.01 (0.58)
16S						
Ecorregião 1	30	-0.8 (0.20)	-25.27* (0.000)	8.95 (3.51-12.90)	0.02 (0.41)	0.02 (0.62)
Ecorregião 2	19	1.54 (0.95)	-20.02* (0.000)	7.97 (0.59-12.01)	0.09 (0.07)	0.14 (0.10)
Ecorregião 3	20	-0.13(0.48)	-19.03* (0.000)	10.98 (2.39-15.24)	0.02 (0.64)	0.03 (0.72)

τ = parâmetro de expansão; SSD = Soma do Desvio Quadrático; Rag = Índice de Raggedness Harpending; * = indicam valores significativos.

O comportamento das populações de *D. furcatus* foi semelhante ao encontrado para *D. melacanthus*. Os valores negativos encontrados nos testes de neutralidade Fs de Fu indicam expansão populacional de *D. furcatus* nas duas ecorregiões (Tabela 6). No caso de *D. furcatus*, as estatísticas Fs de Fu e D de Tajima concordaram entre si para o gene 16S na ecorregião 1.

A análise de distribuição Mismatch resultou em um SSD não significativo ($P>0,05$) para as 2 ecorregiões em ambos os genes, o que indica expansão demográfica, concordando com os testes de neutralidade de Fs de Fu. Para o gene COI, foi encontrado SSD não significativo para a ecorregião 1, enquanto para o gene 16S foi não significativo para as ecorregiões 1 e 2, o que também indica também expansão demográfica (Tabela 6). O índice de

Raggedness Harpending (Rag) não significativo ($P > 0,05$) suporta o modelo de expansão espacial de populações de *D. furcatus* nas ecorregiões (Tabela 6). Os valores de τ (tau) foram maiores para a ecorregião 2 em ambos os genes, sugerindo que as populações nessa região são mais antigas (Tabela 6).

Tabela 6. Estatística dos testes de Neutralidade e análise de distribuição Mismatch para populações de *D. furcatus* agrupadas em ecorregiões, com base nos genes mitocondriais COI e 16S ($P=0,01$).

Ecorregião	N	Tajima's D (Valor P)	Fs' Fu (Valor P)	τ (SD)	SSD (Valor P)	Rag (Valor P)
COI						
Ecorregião 1	25	-0.46 (0.36)	-23.26* (0.000)	9.92 (4.51-13.60)	0.01 (0.34)	0.03 (0.40)
Ecorregião 2	10	1.62 (0.96)	-3.23* (0.04)	19.69 (11.61-25.78)	0.09 (0.00)	0.15 (0.20)
16S						
Ecorregião 1	12	-1.74* (0.02)	-23.71* (0.000)	0.82 (0.13-1.81)	0.01 (0.40)	0.16 (0.47)
Ecorregião 2	3	0.00 (0.78)	-0.07 (0.23)	4.97 (0.99-89.97)	0.16 (0.37)	0.44 (0.83)

τ = parâmetro de expansão; SSD = Soma do Desvio Quadrático; Rag = Índice de Raggedness Harpending; * = indicam valores significativos.

De acordo com a AMOVA de *D. melacanthus* (Tabela 7) baseada em sequências do gene COI, é possível afirmar, a partir do índice de fixação global ($\Phi_{ST}=0,327$), que existe alta estruturação genética entre as populações. Porém, 21,97% desta variação é explicada pelas ecorregiões ($\Phi_{CT}=0,219$), ou seja, a variação reflete a distribuição e diversidade encontrada dentro de cada ecorregião. Este resultado sugere que a distribuição morfoclimática é um fator que pode alterar a adaptação local das populações.

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética das populações de *D. melacanthus* baseado em sequências dos genes mitocondriais COI e 16S.

Fonte de variação	d.f.	Componentes de variância	Variância percentual	Índices de fixação (P-valor)
COI				
Entre populações	13	15,56	32,71	$\Phi_{ST}=0,327$ (P=0,000)
Dentro das populações	81	32,01	67,29	
Total	94	47,58		
Entre ecorregiões	4	11,06	21,97	$\Phi_{CT}=0,219$ (P=0,007)
Entre populações dentro das ecorregiões	9	7,29	14,48	$\Phi_{SC}=0,185$ (P=0,000)
Dentro das populações	81	32,01	63,56	$\Phi_{ST}=0,364$ (P=0,000)
Total	94	50,38		
16S				
Entre populações	11	18,68	62,05	$\Phi_{ST}=0,620$ (P=0,000)
Dentro das populações	59	11,42	37,95	
Total	70	30,10		
Entre ecorregiões	3	-3,70	-12,71	$\Phi_{CT}=-0,127$ (P=0,693)
Entre populações dentro das ecorregiões	8	21,45	73,55	$\Phi_{SC}=0,652$ (P=0,000)
Dentro das populações	59	11,42	39,16	$\Phi_{ST}=0,608$ (P=0,000)
Total	70	29,17		

A AMOVA para os dados de *D. furcatus* (Tabela 8) também demonstra a alta variação genética presente nas populações. O índice de fixação global é alto ($\Phi_{ST}=0,230$) para ambos os genes, confirmando alta estruturação genética entre as populações. 37,36% da variação foi encontrada entre as ecorregiões considerando o gene COI.

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética das populações de *D. furcatus* baseado em sequências dos genes mitocondriais COI e 16S.

Fonte de variação	d.f.	Componentes de variância COI	Variância percentual	Índices de fixação (P-valor)
Entre populações	4	11,90	23,04	$\Phi_{ST}=0,230$ ($P=0,000$)
Dentro das populações	30	39,76	76,96	
Total	34	51,66		
<hr/>				
Entre ecorregiões	1	23,24	37,36	$\Phi_{CT}=0,373$ ($P=0,09$)
Entre populações dentro das ecorregiões	3	-0,78	-1,27	$\Phi_{SC}=-0,020$ ($P=0,000$)
Dentro das populações	30	39,76	23,04	$\Phi_{ST}=0,360$ ($P=0,000$)
Total	34	62,22		
<hr/>				
16S				
Entre populações	4	26,99	38,69	$\Phi_{ST}=0,386$ ($P=0,12$)
Dentro das populações	10	42,77	61,31	
Total	14	69,76		
<hr/>				
Entre ecorregiões	1	6,80	9,33	$\Phi_{CT}=0,093$ ($P=0,20$)
Entre populações dentro das ecorregiões	3	23,33	32,00	$\Phi_{SC}=0,352$ ($P=0,02$)
Dentro das populações	10	42,77	58,67	$\Phi_{ST}=0,413$ ($P=0,13$)
Total	14	72,91		

As relações genealógicas indicaram complexa e antiga relação entre haplótipos com uma divisão em dois haplogrupos muito bem definidos para *D. melacanthus* (Figura 1A). Os haplótipos H46, H47, H48, H49 e H50 formam um haplogrupo localizado mais ao norte e nordeste da América do Sul. O restante dos haplótipos representam uma linhagem localizada mais ao Sul da América do Sul. O haplótipo H21 do gene COI foi o mais frequente encontrado nas populações.

Já a rede de haplótipos do gene 16S demonstrou também grande complexidade com haplótipos separados por um grande número de passos mutacionais (Figura 1B). O grande número de passos mutacionais nos permite definir distintos haplogrupos, mas menos definidos

pela distribuição geográfica. O haplótipo H15 do gene 16S foi o mais frequente encontrado nas populações.

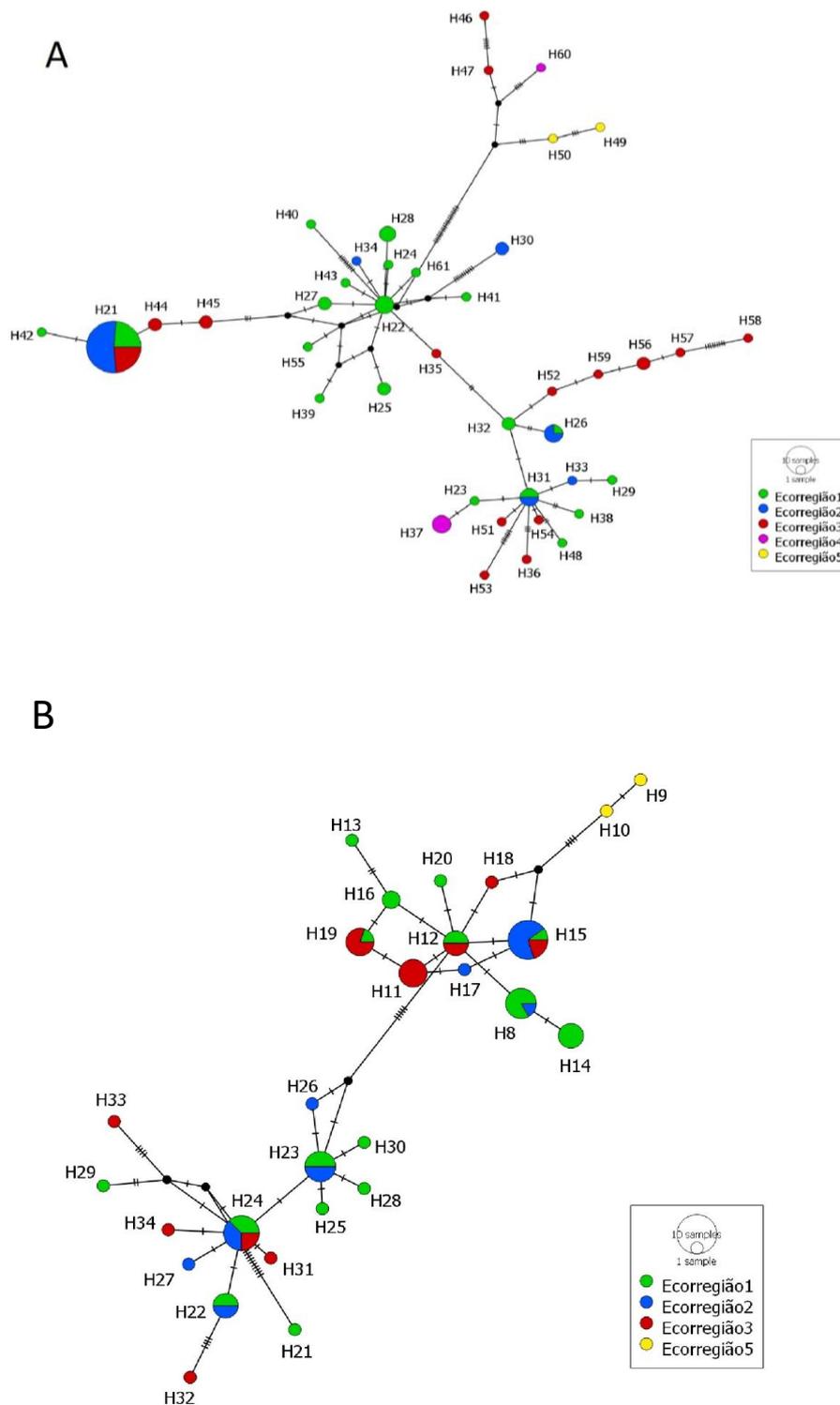


Figura 1. Redes de haplótipos com base em sequências de fragmentos dos genes COI (A) e 16S (B) para indivíduos de *D. melacanthus*.

Para *Dichelops furcatus*, as relações genealógicas também indicam complexa e antiga interação entre haplótipos (Figura 2A). Populações do Sul e Centro-Oeste compartilham haplótipos, sendo os haplótipos H3 e H4 os mais frequentes para o gene COI, enquanto o haplótipo H1 é o mais frequente para o gene 16S (Figura 2B).

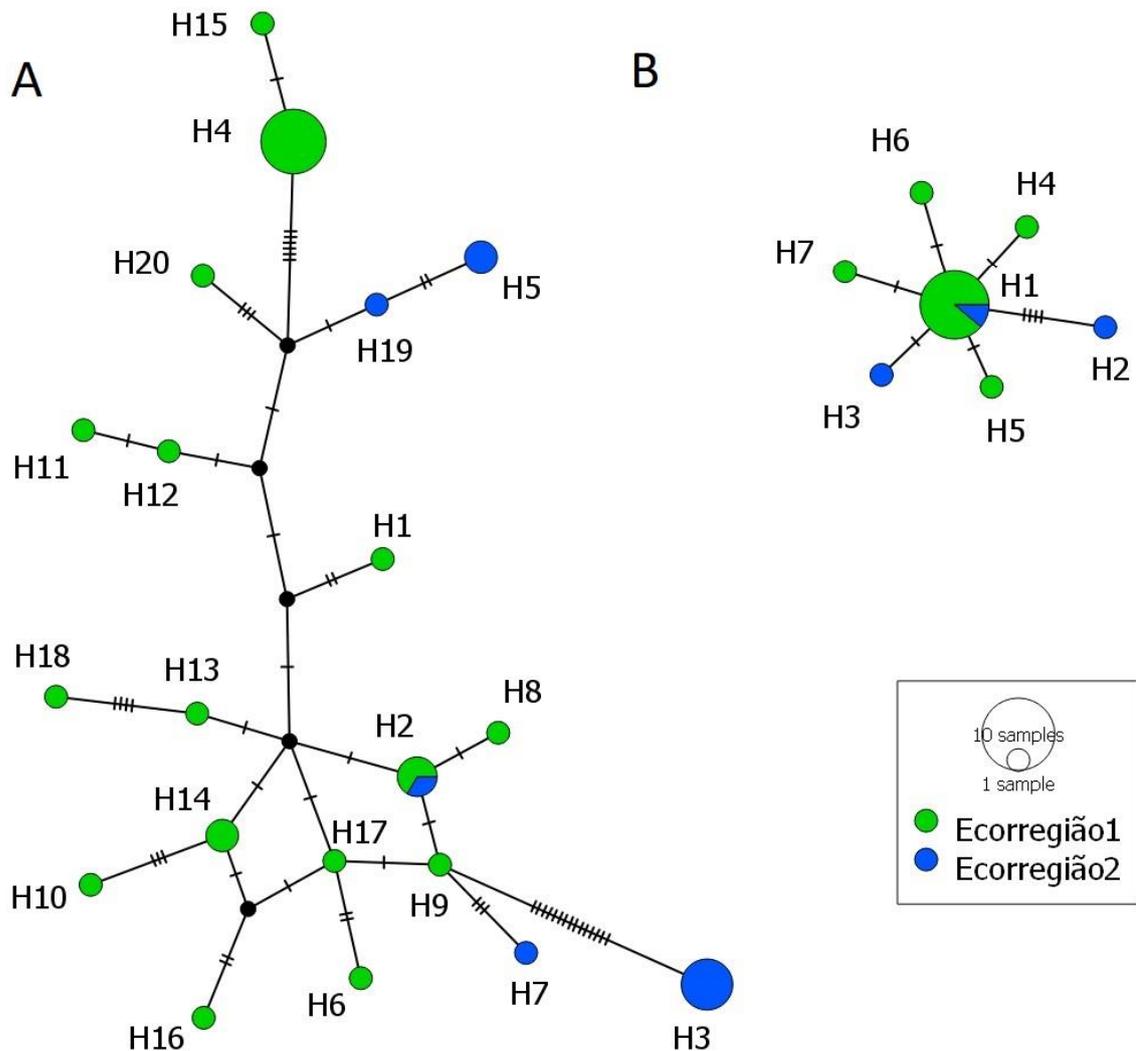


Figura 2. Redes de haplótipos com base em sequências de fragmentos dos genes COI (A) e 16S (B) para indivíduos de *D. furcatus*.

As relações genealógicas para os genes COI e 16S concatenados formam uma rede complexa que denota um tempo grande de divergência entre haplótipos (Figura 3A). Os haplótipos H46, H47 e H48 formam um haplogrupo/linhagem localizada mais ao norte da América do Sul provenientes de Sinop-MT e Colômbia. O haplótipo 28 do gene COI foi o mais frequente encontrado nas populações de *D. melacanthus*, mais especificamente na ecorregião 2.

Considerando os genes COI e 16S concatenados, existe grande divisão entre os haplogrupos das ecorregiões 1 e 2 (Figura 3B). O haplótipo H3 foi o mais frequente encontrado nas populações.

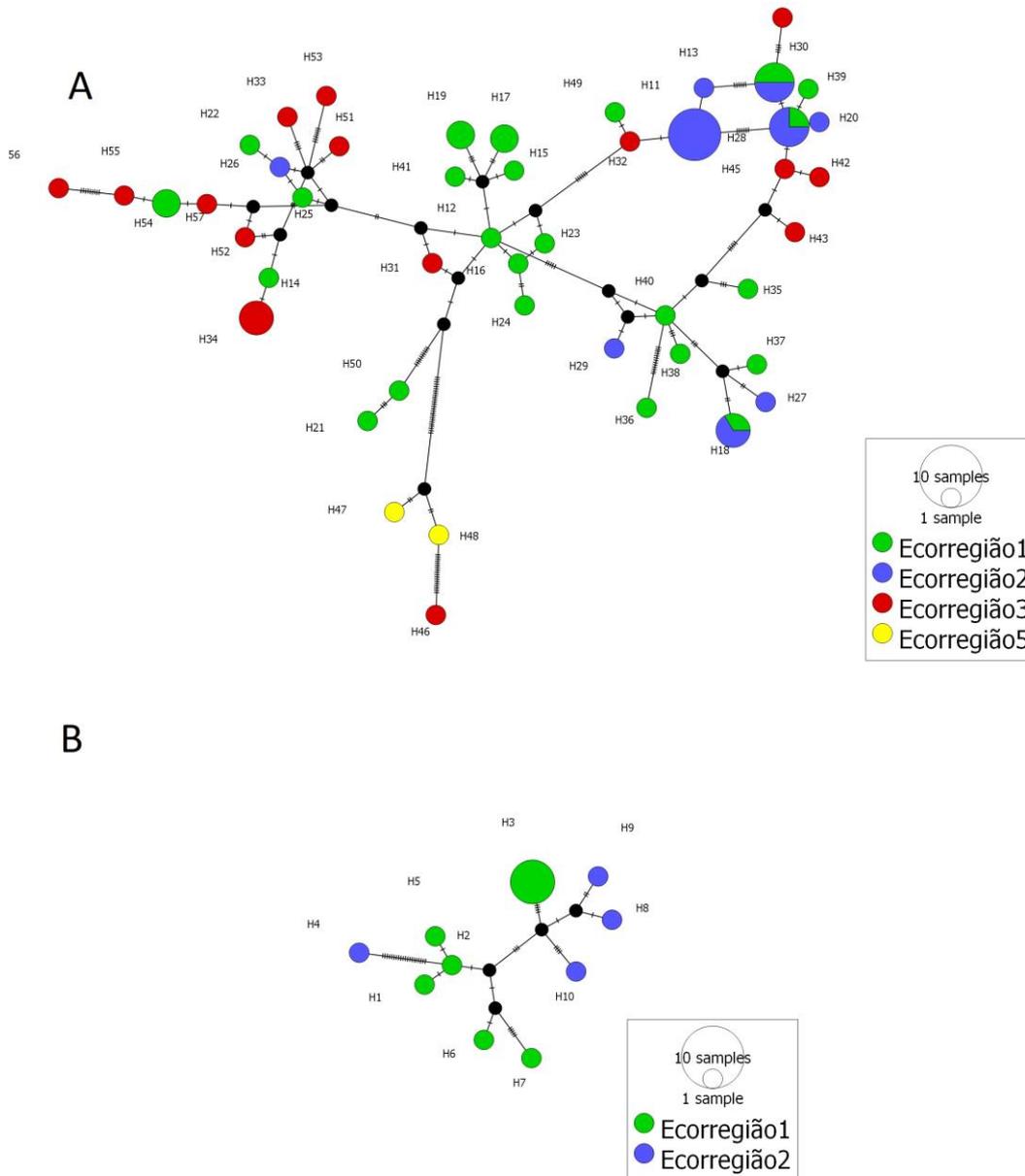


Figura 3. Redes de haplótipos com base em sequências de fragmentos dos genes COI e 16S concatenados para indivíduos de (A) *D. melacanthus* e (B) *D. furcatus*.

A árvore filogenética Bayesiana dos haplótipos de COI-16S concatenados demonstra que *D. melacanthus* é uma linhagem ancestral em relação à *D. furcatus* (Figura 4). A árvore demonstra claramente a complexidade das relações dos haplótipos dentro de *D. melacanthus*, o

que gera um grande número de ramos que apontam subagrupamento de haplótipos (haplogrupos) não resolvidos plenamente, como representado nas redes de haplótipos.

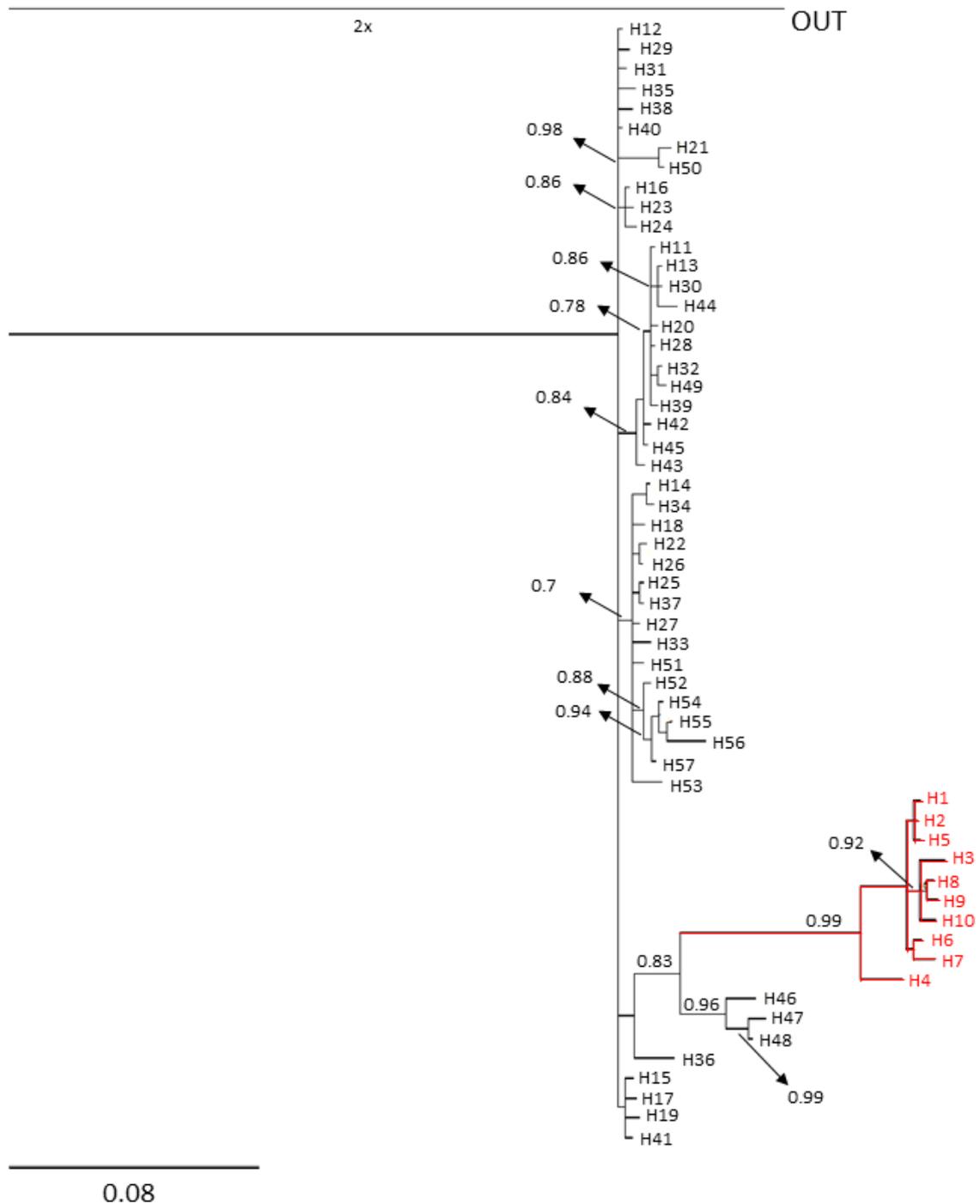


Figura 4. Árvore Bayesiana dos haplótipos de *D. furcatus* e *D. melacanthus* com probabilidades posteriores para cada nó/ramo com base em sequências de fragmentos concatenados dos genes COI e 16S. Probabilidades posteriores menores que 0.7 não foram inseridas. Ramos e haplótipos em vermelho= *D. furcatus*.

O tempo de divergência entre as espécies foi estimado em 1,14 milhões de anos, correspondendo ao período do Pleistoceno (Figura 5). A árvore Bayeasiana não-enraizada sugere duas linhagens bem definidas para *D. furcatus* e duas para *D. melacanthus*.

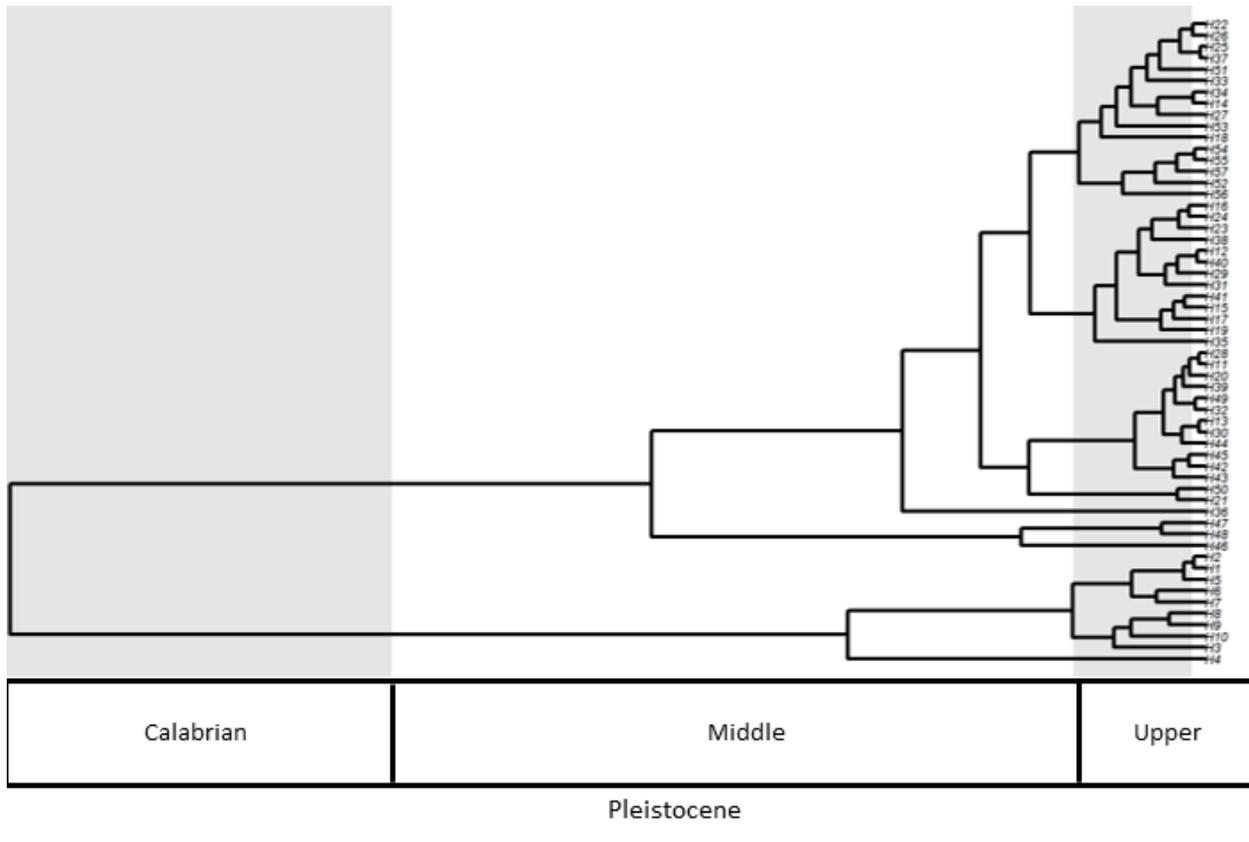


Figura 5. Árvore Bayesiana não enraizada dos haplótipos gerada pelo aplicativo BEAST v4.1.8, com base em sequências de fragmentos concatenados dos genes COI-16S, para populações de *D. furcatus* e *D. melacanthus*.

4.4. DISCUSSÃO

Os resultados do trabalho demonstram uma divergência consistente entre *D. furcatus* e *D. melacanthus*, sem compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre as espécies. Este dado confirma que tratam-se de duas linhagens isoladas que correspondem a duas espécies, apesar da dificuldade na diferenciação das mesmas por caracteres morfológicos (dados não publicados, capítulo 1 desta dissertação). Os dados gerados pela análise filogenética Bayesiana indicam que *D. melacanthus* é uma espécie mais antiga e diversa em relação a *D. furcatus*, que é provavelmente derivada de uma linhagem de *D. melacanthus* há aproximadamente 1,4 milhão de anos no Pleistoceno. Esse é um período reconhecido no qual ocorreram várias alterações nos biomas

brasileiros, com eventos de expansão e retração associados à períodos glaciais e secos (HAYWOOD, & VALDES, 2006). Entretanto, os resultados deste trabalho não permitem explorar precisamente como o processo de especiação ocorreu entre as duas espécies dentro da América do Sul, mas vale ressaltar que pela amostragem e demais levantamentos, *D. furcatus* prevalece ao sul do Brasil, enquanto *D. melacanthus* apresenta uma distribuição mais ampla do norte do Paraná e nas regiões Sudeste e Centro-oeste do país (GRAZIA, 1978; PANIZZI, 2015). Aparentemente, *D. melacanthus* também é mais polífago que *D. furcatus*; enquanto a primeira é amplamente descrita em soja, milho, sorgo e trigo, a última está associada principalmente a trigo (SMANIOTTO, 2015; PANIZZI et al., 2018). Essas características podem gerar hipóteses a serem testadas sobre os eventos e forças evolutivas que atuaram na especiação das duas espécies. Por exemplo, no Plioceno foi o período de formação do cerrado e campos de pastagens que aumentaram o isolamento entre a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica (HAYWOOD & VALDES, 2006).

A alta diversidade genética mitocondrial foi encontrada em todas as populações de *D. furcatus* e *D. melacanthus*, fato comum entre populações nativas de percevejos da família Pentatomidae em diferentes regiões do mundo (CESARI et al., 2017; SOARES et al., 2018). No entanto, podemos destacar a maior diversidade nucleotídica de *D. melacanthus* e *D. furcatus* foram estimadas na ecorregião associada ao cerrado brasileiro, onde possui aproximadamente duas vezes mais diversidade nucleotídica quando comparada a outras ecoregiões brasileiras. Maior diversidade nucleotídica sugere a presença de haplótipos mais divergentes associados a populações mais antigas ou locais de misturas de populações ou linhagens.

A maioria dos índices utilizados apontam para expansão demográfica de *Dichelops* spp. no Brasil. Essa expansão demográfica pode estar ligada à associação com cultivos agrícolas que permitem um aumento do N efetivo das populações devido à maior disponibilidade de recurso. As características da agricultura brasileira como cultivos variados presentes durante todas as estações do ano e a adoção ampla de plantio direto, favorecem a expansão demográfica de várias pragas no Brasil, incluindo percevejos (ALBERNAZ et al., 2012; LEITE et al., 2017; SOARES et al., 2018). Além disso, os maiores valores de τ foram estimados para as ecorregiões 3 para *D. melacanthus* e ecorregião 2 para *D. furcatus*, que representam o Centro-oeste brasileiro, sugerindo que as populações dessa ecorregiões são mais antigas quando comparadas às populações mais ao Sul e Sudeste do Brasil. Esse fato corrobora com estudos que sugerem que um dos centros de diversidade de Pentatomidae na América do Sul é a região Norte, com posterior expansão para regiões mais ao Sul do continente (ROLSTON, 1974; BARCELLOS & GRAZIA, 2003; GENEVCIOUS & SCHWERTNER, 2014). O aumento de amostras de *Dichelops*

spp. oriundas do Norte do país e mais estudos filogeográficos com percevejos Pentatomidae são cruciais para maior robustez dessa hipótese biogeográfica.

As populações de ambas as espécies estão altamente estruturadas com $\Phi_{ST} > 0,23$ para todos os genes testados. A estruturação é explicada significativamente quando dividimos as populações por ecorregiões brasileiras, sugerindo um parcial isolamento por distância (IBD) ou por fator ambiental (IBE). Alta estruturação genética é explicada pela baixa capacidade de dispersão das espécies e o comportamento de dormência na ausência de alimento e em condições abióticas desfavoráveis como temperatura e fotoperíodo, descritas para diversos percevejos que atacam a cultura da soja (MOURÃO & PANIZZI, 2000; MOURÃO & PANIZZI, 2002). O atual cenário da agricultura brasileira pode favorecer o aumento de misturas de populações devido ao transporte de grãos e maquinários agrícolas. Isso pode aumentar a capacidade de adaptação local de populações naturais a novos e perturbados ambientes, pois pool gênicos isolados quando se reencontram, e não possuem nenhum isolamento reprodutivo, permitem a interação de alelos distintos maximizando o potencial adaptativo de uma espécie (LOMBAERT et al. 2010; CRISPO et al., 2011; CHOWN et al., 2015; HAHN & RIESEBERG, 2017).

As relações genealógicas demonstraram-se complexas e antigas, com haplótipos separados por um grande número de passos mutacionais, sugerindo a presença de linhagens mitocondriais distintas dentro das duas espécies. Além disso, a rede de haplótipo é congruente com espécies nativas, de alta diversidade genética e com histórias demográficas complexas (AVISE, 2000). No entanto, a relação geográfica entre os haplótipos não foi muito bem esclarecida tanto quando utilizando a rede de haplótipo, quanto com a análise filogenética Bayesiana, possuindo um grande número de intercessões e baixo bootstrap, respectivamente. Porém, apesar de não-enraizada, a análise filogenética construída juntamente ao relógio molecular, sugere claramente as duas linhagens de ambas as espécies que divergiram há cerca de 1,4 milhões de anos. A rede de haplótipo do fragmento do gene COI demonstrou uma nítida separação de dois haplogrupos formado por haplótipos oriundo de Alagoas, Colômbia e um indivíduo de Sinop-MT, e outro haplogrupo formado por haplótipos oriundo do Centro-oeste, Sudeste e Sul do Brasil (ver figura 2A). Esse resultado pode sugerir a presença de linhagens distintas isoladas em diferentes ecorregiões brasileiras, principalmente onde a agricultura intensiva ainda não é difundida.

Este trabalho reforça a importância do estudo de populações em pragas emergentes, uma vez que é possível inferir padrões de expansão e até mesmo entender a história evolutiva das espécies. Apesar dos genes mitocondriais evoluírem rapidamente devido à alta taxa de mutações, os resultados sugerem resultados importantes acerca dos padrões contemporâneos de evolução

das espécies *D. furcatus* e *D. melacanthus*. No entanto, uma melhor definição sobre a história de vida das espécies requer uma maior amostragem de populações, abrangendo as regiões Norte do Brasil e América do Sul, e maior amostragem de populações de *D. furcatus*. Além disso, a utilização de um gene nuclear pode trazer informações complementares sobre fluxo gênico entre populações e linhagens de ambas as espécies, assim como sugerir eventos de hibridização (fluxo gênico) interespecífico.

4.5. CONCLUSÃO

Os percevejos barriga-verde *Dichelops furcatus* e *Dichelops melacanthus* são linhagens geneticamente divergentes, confirmando a existência de duas espécies com estimativa de divergência de 1,4 milhões de anos. As populações de ambas as espécies encontradas no Brasil possuem alta diversidade genética, estão em expansão demográfica e são estruturadas geograficamente.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, K. C.; SILVA-BRANDAO, K. L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; & OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliopsis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. *Bulletin of entomological research*, 102(3), 333-343, 2012.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489–522, 1987.
- AVISE, J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. **Harvard University Press**, Cambridge, 2000.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37–48, 1999.
- BARCELLOS, A.; J. GRAZIA. Cladistic analysis and biogeography of *Brachystethus* Laporte (Heteroptera, Pentatomidae, Edessinae). *Zootaxa* 256: 1–14, 2003.
- CESARI, M.; MAISTRELLO, L.; PIEMONTESE, L.; BONINI, R.; DIOLI, P.; LEE, W.; GUIDETTI, R. Genetic diversity of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in

- the invaded territories of Europe and its patterns of diffusion in Italy. **Biol. Invas.**, p. 1-20, 2017.
- CHOCOROSQUI, V.R. Bioecologia de *Dichelops (Diceraeus) melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae), Danos e controle em Soja, Milho, e Trigo no Norte do Paraná. 160 p. **Tese** - (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, 2001.
- CHOCOROSQUI, V.R.; PANIZZI, A.R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotrop. Entomol.**, v.33, n.4, p.487-492, 2004.
- CHOWN, S. L.; HODGINS, K. A.; GRIFFIN, P. C.; OAKESHOTT, J. G.; BYRNE, M.; & HOFFMANN, A. A. Biological invasions, climate change and genomics. **Evolutionary Applications**, 8(1), 23-46, 2015.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Percevejos e o sistema de produção soja-milho. **Circular técnica**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos/Embrapa Soja, ISSN: 1516-781X ; n.397, 98 p., 2017.
- CRISPO, E., MOORE, J. S., LEE-YAW, J. A., GRAY, S. M., & HALLER, B. C. Broken barriers: human-induced changes to gene flow and introgression in animals: an examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. **BioEssays**, 33(7), 508-518, 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DRUMMOND, A. J., SUCHARD, M. A., XIE, D., & RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, 29(8), 1969-1973, 2012.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform.** 1, 47–50, 2005.
- FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147, 915-925, 1997.
- GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas a cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 127 p., 1996.
- GENEVCIUS, B. C. & SCHWERTNER, C. F. Review and phylogeny of the geniculata group, genus *Chinavia* (Heteroptera: Pentatomidae), with notes on biogeography and morphological evolution. **Zootaxa**, 3847(1), 033-056, 2014.
- GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera: Pentatomidae, Pentatomini). **Iheringia, Série Zoológica**, v.53, p.3-119, 1978.

- HAHN, M. A., & RIESEBERG, L. H. Genetic admixture and heterosis may enhance the invasiveness of common ragweed. *Evolutionary applications*, 10(3), 241-250, 2017.
- HAYWOOD, A. M. & VALDES, P. J. Vegetation cover in a warmer world simulated using a dynamic global vegetation model for the Mid-Pliocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 237, 412–427, 2006.
- KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* 1991 Aug; 66(4):367-86, 1989.
- LEIGH, J.W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116, 2015.
- LEITE, N. A., CORREA, A. S., MICHEL, A. P., ALVES-PEREIRA, A., PAVINATO, V. A. C., ZUCCHI, M. I., & OMOTO, C. Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental entomology*, 46(4), 1024-1034, 2017.
- LOMBAERT, E.; GUILLEMAUD, T.; CORNUET, J. M.; MALAUSA, T.; FACON, B.; & ESTOUP, A. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PloS one*, 5(3), e9743, 2010.
- MOURÃO, A. P.; & PANIZZI, A. R. Diapause and different seasonal morphs of *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) in Northern Paraná State. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(2), 205-218, 2000.
- MOURÃO, A. P. M., & PANIZZI, A. R. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (Fabr., 1798) (Hemiptera: Pentatomidae). *Brazilian Journal of Biology*, 62(2), 231-238, 2002.
- NYLANDER, J.A.A. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- PANIZZI, A.R. Entomofauna changes with soybean expansion in Brazil. In: Napompeth, B. (Ed.). **Proceedings World Soybean Research Conference**. Bangkok: Kasetsar University, 1997. p.166-168. 581p, 1997.
- PANIZZI, A.R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Invasive species into the U.S.A. and Neotropical species that might invade the U.S.A. **Am. Entomologist** 61, 223-233, 2015.
- PANIZZI, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; SMANIOTTO, L. F.; DA SILVA PEREIRA, P. R. V. Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo. Embrapa Trigo, **Ser. Documentos** 114, 40p., 2015.

- PANIZZI, A. R.; LUCINI, T.; POSSEBOM, T. Development of *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) Reared on Spring Cereals Versus Soybean. **Journal of Insect Science** 18(5): 17; 1–7 v. 18, 2018.
- PAPADOPOULOU, A., ANASTASIOU, I. & VOGLER, A.P. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. **Molecular Biology and Evolution** 27, 1659– 1672, 2010.
- ROLSTON, L. H. Revision of the genus *Euschistus* in Middle America (Hemiptera, Pentatomidae, Pentatomini). **Entomologica Americana** 48(1): 1–102, 1974.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A. HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A. & HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology** 61(3): 539-542, 2012.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP. DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19:2496-2497, 2003.
- SEQUENCHER® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; AND FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences, and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann Entomol Soc Am** 87:651-701, 1994.
- SMANIOTTO, L.F. Biologia e interação com plantas associadas dos percevejos barriga-verde, *Dichelops furcatus* (F., 1775) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. 115p., 2015.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, 98, 7-17, 2015.
- SOARES, P.L.; CORDEIRO, E. M.; SANTOS, F. N.; OMOTO, C.; CORREA, A. S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports** 8, article 2496, 2018.
- TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, 123, 585-595, 1989.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** 28, 2731–2739, 2011.

VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho. **Circular técnica**. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS 13 p., 2015.