

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**  
**CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA**

**LUCIANA LINS OLIVEIRA SANTOS**

**FILOGENIA DE *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**  
**UTILIZANDO MARCADOR MITOCONDRIAL COI**

**São Luís**

**2017**

**LUCIANA LINS OLIVEIRA SANTOS**

Engenheira Agrônoma

**FILOGENIA DE *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)  
UTILIZANDO MARCADOR MITOCONDRIAL COI**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos

Co-orientadora: Profa. Dra. Janaina Marques Mondego

São Luís

2017

Santos, Luciana Lins Oliveira.

Filogenia de *Tibraca limbativentris* STAL 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) utilizando marcador mitocondrial COI / Luciana Lins Oliveira Santos. – São Luís, 2018.

71 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos.

1. Percevejo-do-colmo. 2. Sequenciamento. 3. Marcador molecular. 4. Divergência genética. I. Título.

CDU 633.18

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
MESTRADO EM AGROECOLOGIA

Luciana Lins Oliveira Santos

FILOGENIA DE *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)  
UTILIZANDO MARCADOR MITOCONDRIAL COI

Aprovada em: 28 / 09 / 2017

BANCA EXAMINADORA



---

Profª Drª Raimunda Nonata Santos de Lemos  
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA  
**Orientadora**



---

Profº Drº José de Ribamar Silva Barros  
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA



---

Profº Drº Moisés Rodrigues Martins  
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

“Deus é o maior dos cientistas”.

W. S. Kerr

Em Deus estão escondidos todos os tesouros da  
sabedoria e da ciência.

Colossenses 2:3

*A DEUS, autor da vida, com todas as forças do meu ser.*

*A minha mãe Maria das Neves, irmãos e sobrinhos.*

*Aos meus filhos postíços Francisco Felipe e Enzo Gabriel, companhias mais  
sinceras e amáveis.*

**DEDICO!**

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a **Deus** pela importância que tem em minha vida mediante a fé, mesmo em meio as adversidades.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Agroecologia** da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pela oportunidade para realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão de bolsa de estudo.

À Professora **Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos** pela orientação deste trabalho e pela enorme paciência e equilíbrio.

Ao professor **Dr. Luís Fernando Costa** pela contribuição fundamental para a finalização deste trabalho.

À **Dra. Janaina Marques Mondego** pela Co-orientação.

A **Léo Nava Piorsky Dominici Cruz** pela gentileza e ajuda fundamental para realização deste trabalho.

Aos Professores **Dr. José de Ribamar Silva Barros, Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues e Dra. Claudene Barros** pelas contribuições dadas ao trabalho. E à Professora **Dra. Ester Azevedo da Silva** pelo carinho e amizade.

Ao meu esposo **Raimundo Nonato Viana Santos** por ser amável e compreensível durante esse árduo processo, trazendo sempre uma palavra de ânimo e conforto.

A M.Sc. **Edyane Moraes, Dra. Erlen Keila Candido e Silva e Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira** pelas contribuições.

A todos os Docentes do Mestrado em Agroecologia que contribuíram para meu crescimento científico em especial os amigos **Elizabeth Araújo Costa, Keneson Klay Gonçalves Machado e Elys Regina Carvalho Rocha** e demais colegas do Laboratório de Entomologia pela convivência agradável.

A todos os agricultores visitados que se colocaram à disposição no período de coleta do percevejo-colmo do arroz.

Enfim a todos que de alguma forma participaram desta etapa de minha vida, meu muito obrigada!!!!

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>  | vii           |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | ix            |
| <b>LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>                              | x             |
| <b>RESUMO.....</b>  | xi            |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | xii           |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | 13            |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | 15            |
| 2.1 <b>A cultura do arroz – produção e consumo .....</b>                          | 15            |
| 2.2 <b>Percevejo-do-colmo (<i>Tibraca limbativentris</i> Stal, 1860) .....</b>    | 17            |
| 2.2.1 <b>Aspectos bioecológicos .....</b>   | 17            |
| 2.2.2 <b>Distribuição geográfica .....</b>  | 20            |
| 2.2.3 <b>Danos e importância econômica .....</b>                                  | 20            |
| 2.2.4 <b>Métodos de controle .....</b>  | 21            |
| 2.3 <b>Filogenia e estudos filogenéticos em Insetos da Ordem Hemiptera .....</b>  | 22            |
| 2.3.1 <b>O DNA mitocondrial em estudos filogenéticos .....</b>                    | 26            |
| 2.3.2 <b>Extração e Amplificação de DNA .....</b>                                 | 29            |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | 30            |
| 3.1 <b>Descrição das áreas de coleta – Caracterização dos biomas e municípios</b> | 30            |
| 3.2 <b>Coleta de <i>Tibraca limbativentris</i> .....</b>                          | 34            |
| 3.3 <b>Isolamento e visualização do material genético – DNA .....</b>             | 34            |
| 3.4 <b>Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) .....</b>          | 35            |
| 3.5 <b>Purificação e sequenciamento das PCRs .....</b>                            | 36            |
| 3.6 <b>Análise das sequências.....</b>  | 37            |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | 41            |
| 4.1 <b>Características moleculares .....</b>                                      | 41            |
| 4.2 <b>Análise demográfica .....</b>  | 49            |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>  | 51            |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | 52            |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| FIGURA 1 - Cultivo de arroz em sistema de derruba-queima e pousio: A) área itinerante - Pedreiras, MA (2016), B) consórcio de milho, arroz e mandioca - Vitória-do-Mearim, MA (2016) .....  | 16            |
| FIGURA 2 - Posição alimentar (A) e posturas (B) de <i>Tibraca limbativentris</i> . Pedreiras, MA, 2016. ....  | 19            |
| FIGURA 3 - Representação esquemática de (A) árvore sem raiz e de (B) uma árvore com raiz. ....  | 24            |
| FIGURA 4 - Representação esquemática de agrupamentos monofiléticos (A), parafiléticos (B) e polifiléticos (C).....  | 25            |
| FIGURA 5 - Esquema da molécula de mtDNA mostrando as diferentes regiões que a compõe. ....  | 28            |
| FIGURA 6 - Municípios de coleta das populações de <i>Tibraca limbativentris</i> (A) plotados aos Biomas Maranhenses segundo o IBGE (2004) (B) e Muniz (2006) (C) e distribuição de climas no estado (D).....  | 31            |
| FIGURA 7 - Visualização das bandas em teste realizado para definir temperatura de anelamento ideal para o COI. (1- Lader; 2- amostra 1/ 48°C, 3- amostra 1/50°C, 4- amostra 1/52°C, 5- amostra 1/54°C, 6- amostra 1/58°C, 7- amostra 1/56°C, 8- controle negativo. .... | 36            |
| FIGURA 8 - Fragmentos de sequências de espécimes de <i>Tibraca limbativentris</i> . A- Alinhamento; Edição conforme necessidade nos gráficos de sequência (B) .....   | 37            |
| FIGURA 9 - Gráfico de transição (s) e transversão (v) <i>versus</i> divergência nucleotídica das sequencias do gene COI. A- Grupo interno. B- Grupo interno e Grupo externo.....  | 42            |
| FIGURA 10 - Rede de haplótipos de median joining das sequências de COI de <i>Tibraca limbativentris</i> – MA.....   | 44            |
| FIGURA 11- Árvore de <i>Neighbor-joining</i> das sequências de COI de <i>Tibraca limbativentris</i> -MA e Grupos externos. As letras representam as populações e os números são referentes à sua identificação na amostragem.....                                       | 47            |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 12- Análise de <i>mismtch distribution</i> para sequências de COI de <i>Tibraca limbativentris</i> coletadas ..... | 50 |
|---|----|

**LISTA DE TABELAS**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| TABELA 1- Especificações das reações de sequenciamento desenvolvidas em amostras de <i>Tibraca limbativentris</i> .....  | 37            |
| TABELA 2 - Sequências utilizadas como Grupo externo para análise de filogenia...   | 38            |
| TABELA 3 - Codificação das sequências de <i>Tibraca limbativentris</i> por município..   | 41            |
| TABELA 4 - Estimativa de divergências genéticas pareadas (Kimura 2 parâmetros) para as amostras de <i>Tibraca limbativentris</i> coletadas no MA e os Grupos externos..... | 45            |

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>COI</b>              | Citocromo c oxidase I   |
| <b>DNA</b>              | Ácido Desoxirribonucleico   |
| <b>DNAmt</b>            | DNA mitocondrial  |
| <b>dNTP</b>             | Qualquer um dos quatro possíveis desorribonucleotídeos trifosfatados  |
| <b>ddNTP</b>            | Didesoxinucleótídeos trifosfatados. Não possuem o grupo 3'-OH de dNTPs  |
| <b>EDTA</b>             | Ácido etilenodiamino tetracético  |
| <b>FAO</b>              | Food and Agriculture Organization of the United Nations   |
| <b>FASTA</b>            | Formato de arquivo utilizado em Bioinformática para o intercâmbio de informação entre bancos de dados de sequências |
| <b>GenBank</b>          | Banco de dados de sequência do NIH (National Institutes of Health)  |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Cloreto de Magnésio   |
| <b>NCBI</b>             | National Center for Biotechnology Information   |
| <b>Pb</b>               | Pares de base   |
| <b>PCR</b>              | “Polymerase Chain Reaction”   |
| <b>TE</b>               | Tampão Tris – EDTA  |

**FILOGENIA DE *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)  
UTILIZANDO MARCADOR MITOCONDRIAL COI**

**Autor: Luciana Lins Oliveira Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos**

**RESUMO**

O percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* é um inseto fitófago da família Pentatomidae que causa muitos prejuízos em áreas orizícolas. Sua distribuição no Maranhão ocorre em cultivos de terras altas ou sequeiro, mas também é possível encontrá-lo em várzeas úmidas. Estudos filogenéticos de espécies permitem estimar as relações evolutivas de diferentes grupos. As maiores aplicabilidades estão associadas a correta classificação sistemática e agrupamento das espécies, considerando caracteres morfológicos, comportamentais e genéticos, que podem implicar em sistemas de manejo de pragas. A busca pela similaridade entre os indivíduos indica os caminhos percorridos pelas espécies no curso evolutivo. A sistemática filogenética é uma ferramenta baseada em vários métodos, mas o sequenciamento de regiões do gene fortalece as relações de similaridade. Essas relações podem ser estimadas pela divergência e índices de diversidade genética e representadas por árvores filogenéticas. Neste trabalho, objetivou-se inferir e entender as relações filogenéticas de *T. limbativentris* provenientes de áreas orizícolas em diferentes localidades do Maranhão (Arari, Viana, São Mateus, Pedreiras, Nina Rodrigues, Zé Doca e Caxias) e de outras espécies neotropicais de Pentatomideos, usando o marcador de DNA mitocondrial COI. As análises foram feitas apenas com 27 sequências de *Tibraca*, das quais foram gerados nove haplótipos. As distâncias genéticas para *T. limbativentris* foram baixas com média de 0,41% e valores acima de 14% entre o grupo externo. O arranjo da árvore filogenética confirmou os resultados de divergência apresentando um único clado para as populações de *Tibraca*. Testes de neutralidade indicaram que o grupo populacional da espécie sofreu expansão populacional recente e que a espécie não segue o modelo de tamanho constante.

**Palavras-Chave:** Percevejo-do-colmo. Sequenciamento. Marcador molecular. Divergência genética.

**PHYLOGENIA OF *Tibraca limbativentris* Stal 1860 (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) USING MITOCHONDRIAL MARKER COX1**

**Autor: Luciana Lins Oliveira Santos**

**Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos**

**ABSTRACT**

The stink bug *Tibraca limbativentris* is a phytophagous insect of the family Pentatomidae that causes many damages in rice fields. Its distribution in Maranhão occurs in upland or rainfed crops, but it is also possible to find it in humid floodplains. Phylogenetic studies of species allow us to estimate the evolutionary relationships of different groups. The highest applicability is associated to the correct systematic classification and grouping of the species, considering morphological, behavioral and genetic characters, which may imply in pest management systems. The search for similarity between individuals indicates the paths traveled by the species in the evolutionary course. The phylogenetic systematics is a tool based on several methods, but the sequencing of regions of the gene strengthens the similarity relations. These relationships can be estimated by the divergence and indices of genetic diversity and represented by phylogenetic trees. In this work, the objective of this study was to infer and understand the phylogenetic relationships of *T. limbativentris* from different orchards in different locations of Maranhão (Arari, Viana, São Mateus, Pedreiras, Nina Rodrigues, Zé Doca and Caxias) and other neotropical species of Pentatomideos, using the mitochondrial DNA marker COX1. The analyzes were done with only 27 *Tibraca* sequences, from which nine haplotypes were generated. The genetic distances for *T. limbativentris* were low with a mean of 0.41% and values above 14% among the external group. The arrangement of the phylogenetic tree confirmed the results of divergence presenting a single clade for the populations of *Tibraca*. Neutrality tests indicated that the population group of the species has undergone recent population expansion and that the species does not follow the constant size model.

**Key Words:** Stink bug. Sequencing. Molecular marker. Genetic divergence.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o nono maior produtor de arroz no mundo (FAO, 2014) e o maior produtor do MERCOSUL (Mercado Comum do Sul), atingindo safras entre 11 e 13 milhões de toneladas nos últimos anos e representando 82% de toda produção do bloco (SOSBAI, 2012). O maior estado produtor é o Rio Grande do Sul, responsável por 44,45% da área nacional plantada, respondendo por 67,12% da produção brasileira (CONAB, 2017). Na região Nordeste o estado do Maranhão destaca-se como principal produtor do grão, assumindo a primeira posição no ranque regional e quinta posição no ranque nacional de produção (255,9 mil t/ha) (IBGE, 2017).

A cultura do arroz é atacada por diversos insetos-pragas, destacando-se o percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae). Esta praga ocorre nas fases vegetativa e reprodutiva da planta, manifestando-se a partir da fase de perfilhamento (V3), causando o sintoma denominado “coração morto”, e se estendendo até a fase reprodutiva (R9), provocando o aparecimento da “panícula-branca” (BOTTA; PAZINI; SILVA, 2011). Esses sintomas causam perdas na produção pelo fato de incidirem no definhamento das plantas com a morte da parte interna da planta (folha central) durante a fase vegetativa e murchamento ou espiguetas completamente vazias na fase reprodutiva (FERREIRA et al., 1997).

No Maranhão, o percevejo-do-colmo é encontrado em praticamente todos os municípios orizícolas. O controle dessa praga no estado, assim como no país, é feito principalmente por agrotóxicos (MEUS et al., 2012). No entanto, o uso constante destes produtos eleva os custos de produção, ocasionam danos ao homem e ao meio ambiente, além da possibilidade de surgimento de resistência aos produtos tradicionalmente empregados (MARTINS et al., 2014).

A correta identificação de *T. limbativentris*, o conhecimento de suas características genéticas, bem como a compreensão da relação de parentesco entre suas populações, constitui ferramentas importantes para o estabelecimento de um programa de manejo agroecológico para essa espécie, visando diminuir os impactos que medidas unilaterais de controle, como os químicos, podem causar ao meio ambiente. Para tal, as análises moleculares apresentam-se como importantes ferramentas para auxiliar estudos taxonômicos, esclarecimento de possíveis

relações filogenéticas e compreensão de possíveis relações de parentesco, história evolutiva, e hipóteses das relações de ancestralidade entre os táxons (SCHWARTZ et al., 2000).

Para estes estudos a molécula de DNA mitocondrial é considerada um bom marcador para revelar relações filogenéticas entre os diversos grupos de insetos, pois apresenta alta taxa de evolução (YAGI et al., 1999), não possui íntrons, sua herança é haplóide e possui, basicamente, genes associados às suas funções (RIVERA et al., 2012).

De forma geral os insetos apresentam grande diversidade, em termos de espécies e de habitats, e grande variedade de habilidades para dispersão e seleção de hospedeiros e de respostas à qualidade e quantidade de recursos disponíveis, além de sua dinâmica populacional ser altamente influenciada pela heterogeneidade dentro de um mesmo habitat (THOMAZINI, 2000). Contudo, sabe-se que a redução ou perturbação de habitats naturais para a implantação de atividades agrícolas, assim como a adoção de práticas peculiares nos sistemas de cultivo, dentre elas o uso intensivo de agrotóxicos, podem atuar diretamente no padrão de vida das espécies dentro dos ecossistemas e levar a redução da biodiversidade e/ou aumento populacional de algumas outras, ou ainda fomentar pressões de seleção e modificar padrões ecológicos como, reprodução, mortalidade, densidade populacional, etc..., tanto de pragas, quanto de inimigos naturais (FUTUYMA, 2002). Esses padrões podem correlacionar-se com a composição fitossociológica e demais fatores intrínsecos aos biomas e/ou agroecossistemas e com as perturbações provocadas no ambiente, tais como fragmentação da paisagem pela atividade agrícola. A perda de habitat e a fragmentação de paisagens são responsáveis por vários impactos negativos sobre populações, aumentando chances de extinção, diminuição da riqueza e abundância e modificações na distribuição das espécies nos fragmentos (FAHRIG, 2003; EWERS; DIDHAM, 2006).

A ausência ou presença de inimigos naturais, a oferta de recursos alimentares, reprodutivos e de abrigo podem refletir na dinâmica populacional de pragas e promover alterações no pool genético das populações (FUTUYMA, 2002). Desta forma, o presente estudo objetivou descrever a filogenia de grupos de *T. limbativentris* na cultura do arroz implantadas em municípios pertencentes a diferentes biomas (Baixada maranhense, Cerrado, Mata de transição (Cocais) e área com caracterização de floresta), utilizando o marcador mitocondrial COI.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do arroz – produção e consumo

O arroz pertence ao gênero *Oryza*, uma angiosperma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, ordem Poales, subfamília Oryzoideae e tribo Oryzeae (WATANABE, 1997). Este gênero compreende em torno de 23 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais, subtropicais e temperadas, mas apenas duas espécies são cultivadas: *Oryza glaberrima* (Steudel) e *Oryza sativa* (L.) (LU, 1999). A espécie *O. sativa* apresenta uma maior distribuição mundial, sendo que todas as variedades cultivadas no Brasil pertencem a essa espécie (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2004).

Essa cultura apresenta valor socioeconômico, desempenhando papel importante na alimentação humana, pois representa uma das principais fontes de carboidratos para mais da metade da população mundial (KHUSH, 2005), sendo também rico em proteínas, sais minerais (fósforo, ferro e cálcio) e vitaminas do complexo B, como a B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e B3 (niacina) (SILVA et al., 2012).

No ranking dos maiores produtores mundiais de arroz, o continente Asiático representa cerca de 90% da produção e do consumo global, seguido das Américas (5,9%), África (3,0%), Europa (0,5%) e Oceania (0,1%) (FAO, 2016). No ranking nacional, a Região Sul está em primeiro lugar em produção (10.017,7 em 1000t), seguida pela Região Norte (1.086,1 em 1000t), Região Centro-Oeste (732,3 em 1000t), Região Nordeste (436,8 em 1000t) e Região Sudeste (53,7 em 1000t) (CONAB, 2017). O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro, com participação de 70,8% na atual safra (IBGE, 2017).

Na Região Nordeste o Maranhão é o principal produtor (255,9 em 1000t), com destaque para os municípios de Santa Luzia, Grajaú, Barra do Corda, Arari, Bom Jesus das Selvas, Mirador, Tuntum, Vitória do Mearim, São Domingos do Maranhão e Colinas (SAGRIMA, 2013). Santos e Santiago (2004) apontaram ainda São Mateus, Pindaré Mirim, Monção, Igarapé do Meio, Viana e Araiões como importantes produtores. Barreirinhas, Pastos Bons e Paraibano também se destacam (SAGRIMA, 2016).

A diversidade de solos, clima e vegetação do Estado permitem que o arroz seja cultivado sob três sistemas, predominando a produção em terras altas (no sistema de corte e queima), o cultivo de várzeas úmidas em menor escala e culturas irrigadas, desenvolvidas

principalmente na região do baixo Mearim, com destaque para os municípios de Arari, São Mateus do Maranhão e Vitória do Mearim, conduzido por produtores, geralmente, originários do sul do país (FERRAZ JÚNIOR, 2000).

No sistema de cultivo de terras altas, a umidade é o fator limitante da produção sendo, portanto, necessária para o crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz. Como esse sistema é dependente da quantidade e distribuição das chuvas, Fornasieri e Fornasieri-Filho (2006) relatam que, no Brasil, podem ser caracterizadas classes ou áreas consideradas muito favoráveis de acordo com a quantidade de água disponível para as raízes e que entre as áreas consideradas muito favoráveis estão o norte de Goiás, o norte estado do Mato Grosso e o Maranhão. Estes mesmos autores enfatizam que nos estados brasileiros produtores de arroz de terras altas predominam os solos do tipo Latossolos e Podzólicos; no estado do Maranhão, mais de 60% dos seus solos pertencem a esses grupos.

A prática do cultivo do arroz no Maranhão é realizada principalmente por pequenos agricultores em um sistema itinerante, de derruba-queima e pousio, em consórcio com outras culturas, destacando-se feijão, milho e mandioca (Figura 1), sendo pouco frequente o cultivo isolado (FERRAZ JÚNIOR, 2004). Também evidencia-se o uso de variedades rústicas, ausência de tecnologia e assistência técnica, e manejos inadequados de doenças e pragas, que juntos limitam drasticamente a produtividade e o sucesso dessa cultura no estado.

**Figura 1.** Cultivo de arroz em sistema de derruba-queima e pousio: A) área itinerante - Pedreiras, MA (2016), B) consórcio de milho, arroz e mandioca - Vitória-do-Mearim, MA (2016).



Foto: SANTOS, Raimundo, N.V., 2016

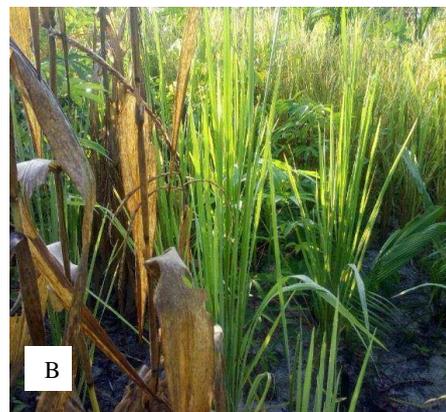


Foto: OLIVEIRA, Luciana, L., 2016

## 2.2 Percevejo-do-colmo (*Tibraca limbativentris* Stal, 1860)

### 2.2.1 Aspectos bioecológicos

A espécie *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 pertence à ordem Hemiptera. Os Hemipteras são insetos exopterigotos e hemimetábolos divididos em três Subordens: Auchenorrhyncha, Heteroptera e Sternorrhyncha (CRYAN; URBAN, 2012). A subordem Heteroptera, em especial, engloba insetos que apresentam grande variedade no modo de vida. Eles possuem habitat diversificado, sendo que, a maioria das famílias ocorre em todos os continentes (exceto na Antártica) e em muitas ilhas (GOMES, 2013). A maioria vive no ambiente terrestre, tanto nas plantas quanto no chão (entre a areia, debaixo das pedras ou nas rachaduras do substrato) (GOULA; MATA, 2015). O grande número de espécies descritas (aproximadamente 40.000), a variedade de habitat e a alimentação sugerem que esses animais têm um longo curso evolutivo (SCHUH; SLATER, 1995; WEIRAUCH; SCHUH, 2011).

Dentre os Heteropteras, a família Pentatomidae é uma das mais importantes reunindo cerca de 4.100 espécies em 760 gêneros, sendo a quarta família mais diversa dos heterópteros, e com ampla distribuição mundial (GRAZIA et al., 1999). Muitas espécies de pentatomídeos apresentam importância como insetos-pragas em diversas culturas. No arroz, o percevejo-do-colmo *T. limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) é considerado uma das pragas principais, ocorrendo tanto em cultivos sequeiros quanto irrigados, sendo responsável por ocasionar prejuízo de até 90% no rendimento dos grãos (FERREIRA et al., 1997). É um inseto com ampla distribuição geográfica e está presente em todas as regiões orizícolas da América Latina (MARTINS et al., 2004).

No Brasil, o percevejo-do-colmo também é conhecido como percevejo-marrom, percevejo-das-hastes e percevejo-grande-do arroz (BOTTON et al., 1996). No Maranhão, este inseto é conhecido regionalmente como “Cangapara”, devido sua aparência na fase adulta assemelhar-se ao quelônio de igual nome muito comum na Baixada Maranhense (PEREIRA, 2002).

Por serem geralmente polípagos, os percevejos utilizam plantas não cultivadas como alternativa para manutenção populacional. No período da entressafra do arroz, o percevejo-do-colmo hiberna na base de plantas de diferentes espécies hospedeiras, próximo ao solo, local de maior umidade, permanecendo neste estado por 4 a 6 meses (BARRIGOSI; MARTINS, 2006). No Maranhão o principal hospedeiro para diapausa durante a época seca é

a espécie *Attalea speciosa* Mart. Ex. Spreng, Arecaceae (palmeira babaçu), principalmente as palmeiras mais jovens (pindobas). A alta densidade de babaçu e suas características estruturais tornam esse hospedeiro atrativo ao *T. limbativentris*, proporcionando ambiente protegido e úmido até a safra seguinte servindo como fonte de alimento e/ou abrigo (COSTA, 2014). Quando o arroz torna a ser cultivado, o percevejo migra novamente para as áreas de cultivo. Isso ocorre cerca de 20 dias após a emergência das plântulas, quando os adultos hibernantes invadem as lavouras, sendo encontrados na base dos colmos, próximos ao colo das plantas, onde ocorre a reprodução (BARRIGOSI; MARTINS, 2006).

Quanto aos aspectos biológicos, *T. limbativentris* apresenta metamorfose incompleta e períodos de desenvolvimento sensíveis a temperatura e umidade do local. Prando et al. (1993) registraram ciclo variável de 63 a 77 dias, enquanto Botton et al. (1996) registraram 37,5 dias de vida em insetos mantidos em casa de vegetação, com temperatura média de 28°C. Silva et al. (2004) registraram aproximadamente 60 dias a uma temperatura média de 26°C.

Os adultos são marrons na parte dorsal e marrom escuro na face ventral, e possuem proporção sexual de um macho para cada fêmea (BOTTON et al., 1996; FERREIRA et al., 1997). Durante o ciclo de vida do *T. limbativentris*, as fêmeas podem ser fecundadas várias vezes e a cópula pode ocorrer mais de 27 vezes (BOTTON et al., 1996), mas não se sabe exatamente se com um macho apenas, ou com machos diferentes ao longo do ciclo reprodutivo. Os insetos alimentam-se da seiva em posição de “cabeça para baixo” na base das plantas e suas posturas são colocadas principalmente na parte abaxial das folhas de forma enfileirada. As posturas podem ser agrupadas de 2 a 6 fileiras (TRUJILLO, 1970; PANTOJA et al., 2007) (Figura 2). Tanto a oviposição quanto a emergência de adultos, ocorrem predominantemente nos períodos crepuscular e noturno (SILVA et al., 2004).

**Figura 2.** Posição alimentar (A) e posturas (B) de *Tibraca limbativentris*. Pedreiras, MA, 2016.



Fotos: OLIVEIRA, Luciana, L., 2016.

As fêmeas apresentam-se com tamanho superior aos machos e iniciam o período sexual quando migram para as áreas de arroz (PANTOJA et al., 2007). Durante o seu ciclo de vida, cada fêmea de *T. limbativentris* oviposita em média 268,67 ovos, podendo em alguns casos chegar até 900 ovos (RIFFEL, 2007). Os ovos são cilíndricos, medindo 1 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, apresentam coloração inicial esverdeada ficando escura com a proximidade da emergência das ninfas (FERREIRA et al., 1997), que possuem duração média de sete dias e 89% de sobrevivência. O período ninfal apresenta cinco instares bem definidos e facilmente influenciados pela temperatura. No primeiro instar, as ninfas permanecem agregadas e não se alimentam dos colmos, o que ocorre a partir do segundo instar (BOTTON et al., 1996; FERREIRA et al., 1997; SILVA et al., 2004).

A dispersão de *T. limbativentris* ocorre principalmente por locomoção no solo ou voos curtos em busca de umidade e/ou hospedeiros para permanência após o período da safra (FERREIRA et al., 1997). Voos mais longos só ocorrem quando o inseto não encontra condições favoráveis para sua permanência no local, como ausência de hospedeiros e ausência de umidade (TRUJILLO, 1970). No Maranhão essa dispersão é induzida principalmente pelo sistema itinerante de cultivo adotado pelos agricultores familiares. As áreas de produção sempre mudam a cada ano.

### 2.2.2 Distribuição geográfica

A espécie *T. limbativentris* não se encontra amplamente distribuída no mundo, mas em regiões neotropicais. Há relatos de ocorrência de *T. limbativentris* na Argentina (TRUJILLO, 1970), Peru, Equador, República Dominicana, Colômbia e Venezuela (PANTOJA et al., 1995). No Brasil, o percevejo-do-colmo ocorre na maioria dos estados em que o arroz é cultivado: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Amazonas, Roraima, Acre, Rondônia, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Norte, Piauí e Maranhão (FERREIRA et al., 1997).

No Maranhão essa praga está presente em praticamente toda extensão do estado, desde áreas de baixada até as de Floresta e Cerrado. É possível encontrar o percevejo-do-colmo em todos os agroecossistemas de arroz, principalmente em áreas em que o solo é mantido com umidade superficial, essa condição é favorável ao aumento populacional do inseto (TRUJILLO, 1970).

### 2.2.3 Danos e importância econômica

Em áreas de produção, as plantas de arroz estão sujeitas ao ataque do percevejo-do-colmo a partir de 20 dias de emergência, pois nessa fase as plantas apresentam altura média de 25-30 cm e possuem consistência suficiente para sustentação do inseto e introdução das peças bucais para alimentação (RAMPELOTTI, 2005; MARTINS et al., 2004).

No processo de alimentação, os percevejos ao introduzirem seu aparelho bucal no colmo das plantas, injetam uma substância tóxica, que ocasiona estrangulamento do colmo. A interrupção do fluxo de seiva resulta na morte da planta, pelo murchamento da folha central durante a fase vegetativa (“coração morto”). Na fase reprodutiva, ocorre o sintoma de “panícula branca”, ou espiguetas vazias, sendo que apenas um único indivíduo, após 12 a 24 horas de sucção do colmo, é suficiente para ocasionar os dois tipos de sintomas (MARTINS et al., 2004; BARRIGOSSI et al., 2004; RIFFEL, 2007).

Em geral, adultos e ninfas ficam escondidos no meio dos colmos das plantas hospedeiras, próximo ao solo, o que dificulta a detecção e as medidas de controle, que devem ser realizadas quando for encontrado um percevejo adulto por m<sup>2</sup>, na fase vegetativa da cultura (FERREIRA et al., 1997). Por sua vez, Costa e Link (1992) verificaram que o nível de dano econômico desta praga está associado as fases fenológicas da planta, de modo que na

fase vegetativa a redução na produção é de 58,7 kg/ ha e na fase reprodutiva, um percevejo/m<sup>2</sup> reduz a produção em 65,16 kg/ ha.

#### 2.2.4 Métodos de controle

No Brasil, atualmente, o principal método de controle do *T. limbativentris* é o químico. Recomenda-se que deva ser realizado quando a infestação, em plantas com 40 a 50 dias de idade for de 1 a 2 percevejos por 15 colmos ou por m<sup>2</sup> (FERREIRA et al., 1997; MARTINS et al., 2000). Contudo, o maior problema associado ao percevejo-do-colmo é o fato desse controle ser efetuado sem considerar princípios do manejo integrado de pragas (MARTINS et al., 2009).

O controle químico é ineficiente, pois os insetos se alojam na base dos colmos quando as plantas se desenvolvem, dificultando a ação do inseticida em atingir os indivíduos alojados na parte baixa do dossel das plantas (AGEITEC, 2017). No Maranhão, a utilização de agrotóxicos por produtores de arroz é comum, mas sabe-se que essa prática provoca desequilíbrios no ecossistema, polui o meio ambiente e pode ser prejudicial à saúde do produtor, partindo da premissa que muitos agricultores familiares utilizam os produtos sem equipamentos de proteção individual adequados e sem assistência técnica prévia (BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013). Além disso, o controle químico atua também sobre populações de inimigos naturais do percevejo devido a sua não seletividade, e pela possibilidade de gerar populações de insetos praga mais resistentes ao controle químico.

O monitoramento populacional dos insetos nas lavouras é importante para estratégias de controle e deve ser efetuado em intervalos semanais, do início do perfilhamento das plantas à fase de floração (MARTINS et al., 2017). Para a amostragem, recomenda-se contar o número de adultos em 1m<sup>2</sup> em, pelo menos, 10 pontos a partir das bordas da lavoura. O controle é recomendado quando for encontrado um percevejo por m<sup>2</sup>, em média (BARRIGOSI; MARTINS, 2017).

Para o manejo do percevejo-do-colmo, recomenda-se a adoção de práticas promotoras da redução populacional em níveis mínimos, tais como: diminuir o número de plantas hospedeiras no interior e ao redor dos campos, bem como os restos culturais e os materiais que sirvam de abrigo ao percevejo na entressafra da cultura (BARRIGOSI; MARTINS, 2017). O método cultural é eficiente na redução da infestação remanescente em áreas

anteriormente infestadas pelo percevejo-do-colmo, e pode ser implementada por meio de pastoreio, destruição de taipas e, fundamentalmente, pelo preparo antecipado do solo (SOSBAI, 2014).

No manejo de pragas, estratégias inerentes ao *T. limbativentris* podem ser adotadas mediante o avanço de pesquisas, tais como a utilização de variedades resistentes, avaliação da patogenicidade de fungos e do seu potencial para uso comercial (MARTINS et al., 2004; RAMPELOTTI et al., 2007), prospecção de parasitoides (MACIEL et al., 2007; RIFFEL et al., 2007), utilização de feromônios (MARTINS et al., 2009), além do conhecimento das características genéticas que possibilitem a identificação e o estabelecimento de marcadores moleculares que apontem para populações resistentes a inseticidas (MARTINS et al., 2005).

### 2.3 Filogenia e estudos filogenéticos em insetos da Ordem Hemiptera

Os seres vivos apresentam “elos de consanguinidade”, isto é, laços de parentesco que os aproximam uns dos outros (LOPES; VASCONCELOS, 2012). Em sistemas de classificação, por muito tempo considerou-se que aspectos semelhantes, principalmente morfológicos, citológicos e embriológicos poderiam ser utilizados para agrupamento de organismos, partindo da premissa que aqueles com relação de parentesco próxima são mais semelhantes que organismos com relação de parentesco relativamente mais distante (LOPES; HO, 2017).

No entanto, as interpretações nas relações de parentesco possuíam cunho subjetivo e arbitrário, que dependiam da visão do pesquisador ou de determinada característica ser mais evidente que outras (SANTOS, 2008). Diversos critérios podem ser utilizados para embasar um sistema de classificação, porém, as classificações com frequência são conflitantes entre si (LOPES; VASCONCELOS, 2012). Desse modo, há necessidade de métodos analíticos para determinar a validade dos caracteres homólogos no processo de classificação e definição de uma população, raça ou espécie (BIO212, 2017). Segundo Radford; Caddell (1986) geralmente, as homologias são baseadas em algumas evidências de similaridade direta (por exemplo, de estrutura, de posição, ou desenvolvimento) ou similaridade via uma série gradativa (por exemplo, formas intermediárias entre estados de caracteres).

A cladística ou sistemática filogenética entra nesse contexto como uma teoria capaz de lidar com os conflitos gerados pelos morfologistas por um meio analítico, ou seja, é uma

ferramenta para entender como os seres vivos conectam-se ao longo de sua história (GUIMARÃES, 2005). Hennig (1966) afirma que a cladística é um ramo da sistemática interessado na reconstrução da filogenia, que por sua vez é a história genealógica de um grupo de organismos e uma representação hipotética das relações ancestral/descendente. O objetivo da sistemática é criar um sistema geral de referência que refletisse diretamente os resultados do processo evolutivo, constituindo-se como o critério mais apropriado para uma classificação consistente dos organismos do ponto de vista evolutivo (AMORIM et al., 2002).

A análise filogenética fundamenta-se no teste de congruência entre os caracteres inicialmente considerados homólogos, ou seja, se eles estiverem presentes no ancestral comum. O objetivo da congruência é verificar as hipóteses de homologia e delimitar grupos monofiléticos (do grego monos = único; filético = refere-se à linhagem), descobrindo as relações evolutivas entre os organismos (SANTOS; CALOR, 2008).

A filogenia tornou-se amplamente conhecida a partir de 1966 e, de lá até hoje, passou a ser considerada o instrumento de sistematização mais adequado para a diversidade dos seres vivos (LOPES; VASCONCELOS, 2012).

Os conflitos existentes na compreensão evolutiva, quando analisados sob o ponto de vista genético, tornam-se mais claros e fica evidente que a sede das mudanças evolutivas está na matéria prima que é a variação genética (ALBERTS et al., 2017). Estudar as mudanças evolutivas a que estes caracteres estão sujeitos é estudar as mudanças que ocorrem no próprio material genético (BIO212, 2017). De acordo com Sunnucks (2000) e Avise (2004), a utilização de dados moleculares vem sendo feita com maior frequência em diversos estudos nos mais diferentes grupos taxonômicos, contribuindo para avanços consideráveis no conhecimento da biologia das espécies, ecologia, comportamento, genética e evolução.

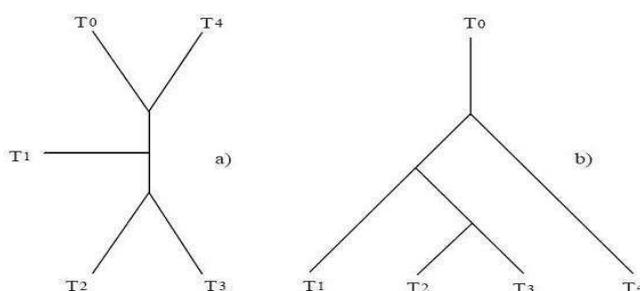
Estudos filogenéticos têm mostrado que em alguns casos as relações entre os táxons são complexas, principalmente por se observar incongruências ao serem contrastados dados morfológicos e genéticos (PACHECO; PATTERSON, 1991).

Em termos filogenéticos, a explicação mais simples de relação entre os organismos é aquela que assume o menor número de passos evolutivos, ou seja, o menor número de mudanças de estado dos caracteres (LOPES; HO, 2017). Geralmente esses resultados dos grupos biológicos são expressos em árvores filogenéticas. Nelas, é possível identificar o parentesco entre grupos atuais, entender claramente quem é a espécie ancestral e perceber a dinâmica de transformação da vida no tempo (LOPES; VASCONCELOS, 2012). Estes

métodos são em geral executados por programas de computador, mas em alguns casos, pode-se executar até mesmo de maneira manual (LOPES; HO, 2017).

As árvores filogenéticas podem ser de dois tipos: enraizadas (possuem uma origem) ou não enraizadas. As árvores sem raiz apresentam apenas a noção de distância entre os vértices e não apresentam as noções de ancestralidade. Enquanto que em árvores com raiz fica implícita a noção de tempo e de antepassado comum a todos os outros vértices (DARLU; TASSY, 2004) (Figura 3). Na construção de árvores enraizadas, deve-se definir o posicionamento da raiz com base na determinação de pelo menos um grupo externo, ou seja, de pelo menos uma linhagem que não faça parte das linhagens de interesse, chamadas grupos internos (LOPES; HO, 2017).

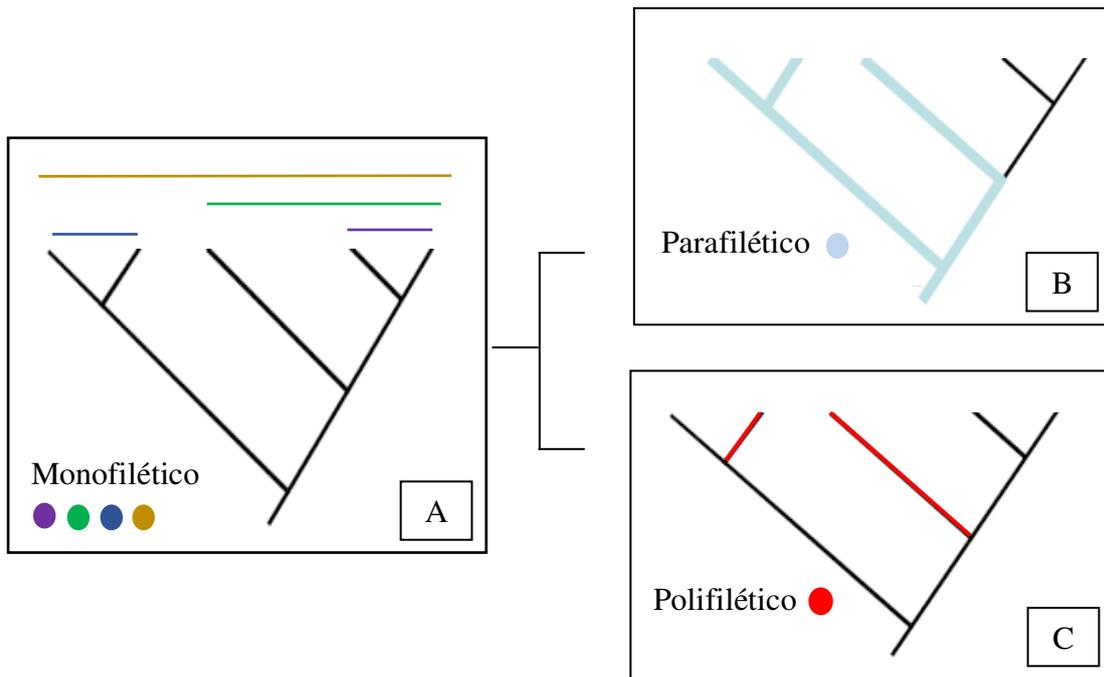
Figura 3: Representação esquemática de (a) árvore sem raiz e de (b) uma árvore com raiz.



Fonte: DARLU; TASSY, 2004.

A monofília, por sua vez, expressa-se pela inclusão do ancestral comum e todos os seus descendentes (SOUZA; ROCHA, 2015). Em árvores com grupos monofiléticos, os diagramas ramificados agrupam táxons que dividem um ou mais caracteres derivados (PEDERNEIRAS, 2011). Nesse contexto, outros termos são também empregados para demonstrar formas de agrupamento, tais como grupos parafiléticos (incluem o ancestral comum, mas nem todos os seus descendentes) e polifiléticos (não incluem o ancestral imediato, pois incluem espécies ou grupos de diferentes ancestrais que se formam a partir dos grupos monofiléticos) (UNIFOA, 2012) (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática de agrupamentos monofiléticos (A), parafiléticos (B) e polifiléticos (C).



Fonte: Adaptado de UNIFOA, 2012.

Estudos filogenéticos são importantes para analisar semelhanças fortemente constatadas geneticamente entre espécies. Do ponto de vista prático, conhecer a genealogia das espécies, permite ampliar conhecimentos que podem refletir em conservação ou manejo das mesmas (CIANCIARUSO et al., 2009).

Em Hemipteras alguns trabalhos filogenéticos já foram desenvolvidos. Na subordem Heteroptera, os primeiros estudos moleculares foram realizados por Wheeler et al. (1993), utilizando caracteres morfológicos combinados com dados moleculares do gene ribossomal 18S, propondo uma filogenia que mostrava as relações entre suas infraordens. Muraji e Tachikawa (2000) analisaram a infraordem Gerromorpha a partir de sequências dos genes 16S (DNAm) e 28S (gene nuclear ribossomal). Hebsgaard et al. (2004) estudaram as relações filogenéticas em Nepomorpha combinando dados moleculares dos genes 16S, 28S e 18S com 65 caracteres morfológicos. Outra infraordem muito estudada, e que já tem suas relações estabelecidas, é a Pentatomomorpha, que foi analisada também por caracteres morfológicos aliados a dados moleculares (gene 18S e citocromo oxidase I), confirmando seu *status* monofilético (LI et al., 2005). Grazia et al. (2008), ao analisarem Pentatomoidea a partir de

dados moleculares, utilizando os genes 18S, 16S, 28S e COI, juntamente com caracteres morfológicos, reconheceram a monofilia desta superfamília. Neste mesmo estudo ao analisar algumas famílias de Pentatomoidea, foi verificado que Acanthosomatidae e Pentatomidae também são grupos monofiléticos, ao passo que a família Cydnidae se mostrou polifilética. Outro exemplo foi o estudo realizado por Weirauch e Munro (2009), que verificaram táxons da família Reduviidae, como a subfamília Triatominae e as tribos Triatomini e Rhodniini. Gomes (2013) inferiu relações filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae baseadas em sequências de genes mitocondriais (Cyt b, COI e 16S), nucleares (28S e 18S), e concluiu que na família Coreidae, na maioria das análises, houve formação de agrupamentos monofiléticos, ocorrendo o mesmo na família Pentatomidae.

É importante desenvolver estudos moleculares para apoiar ou confirmar a história evolutiva dos Pentatomidae para fortalecer relações evolutivas entre as espécies para essa subordem.

### 2.3.1 O DNA mitocondrial em estudos filogenéticos

Os métodos utilizados para caracterização genética de indivíduos e populações têm avançado com o progresso da genética molecular. Na última década, o uso crescente de marcadores genéticos deu origem à taxonomia molecular (BUENO-SILVA, 2012). Esse recente progresso gerou conhecimento e ferramentas para estudos filogenéticos e populacionais, aumentando a capacidade de identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de diversos ecossistemas, assim como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de organismos (ROSA; PAIVA, 2009).

A complexa interação entre genótipo, fenótipo e ambiente pode ser considerada um dos principais motivos que impulsionaram o desenvolvimento de marcadores moleculares para o estudo genético de espécies (BUENO-SILVA, 2012).

O uso combinado de marcadores associados às metodologias estatísticas tem sido eficiente para a identificação de espécies e suas especificidades, assim como em estudos evolutivos de biogeografia e padrões de migração (ROSA; PAIVA, 2009). De acordo com Avise (1994), as duas principais vantagens dos marcadores moleculares são o fato de serem pouco influenciados pelo ambiente e o grande número de caracteres/estados informativos disponíveis em cada organismo. Além disso, DNA e proteínas são características diretamente

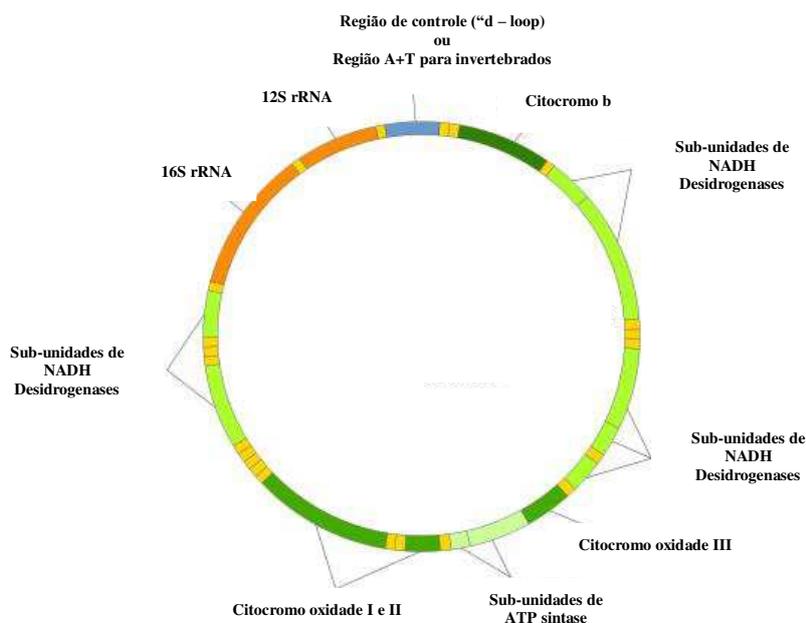
herdáveis das quais as bases genéticas e os modos de transmissão podem ser especificados, diferenciando homologies de analogias (ZOLET et al., 2013).

Nesse contexto, o DNA mitocondrial é particularmente favorável a estudos fitogeográficos pelo fato de geralmente apresentar transmissão exclusivamente materna, ausência de recombinação e altas taxas evolutivas (taxas de mutação) quando comparado ao genoma nuclear (AVISE, 2000). O genoma mitocondrial é muito útil, visto que é um dos maiores conjuntos gênicos que podem ser comparados entre diversos táxons animais, sendo uma fonte eficaz para resolver filogenias de níveis taxonômicos menores que famílias (HUA et al., 2009).

As mitocôndrias são organelas presentes em quase todas as células eucarióticas. São constituídas por uma membrana externa e uma membrana interna que possui várias invaginações (cristas mitocondriais) que aumentam a sua área de superfície. No seu interior, encontra-se a matriz mitocondrial onde estão dispersas enzimas, ribossomos, RNA e DNA (MAGALHÃES, 2015). As mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP via fosforilação oxidativa e estão presentes em quase todos os eucariontes (ROSA; PAIVA, 2009). Uma mitocôndria contém entre 2 a 10 cópias de mtDNA e cada célula pode ter entre dezenas a milhares destas organelas (CAVELIER et al., 2000). Dessa forma, enquanto a maioria das células possui apenas duas cópias de DNA nuclear, as mesmas podem conter entre 1.000 e 100.000 cópias de mtDNA, dependendo do tipo de célula e dos seus requerimentos energéticos (CHINNERY; HUDSON, 2013).

O mtDNA é uma molécula circular pequena e apresenta conteúdo gênico altamente conservado evolutivamente (GONÇALVES, 2010). O genoma mitocondrial de todos os animais, com poucas exceções, possui 37 genes: dois genes codificam para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para RNA transportadores (tRNA), 3 para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI I, II e III), um gene para o citocromo B, 2 para as subunidades da ATPase e 7 para as subunidades da NADH desidrogenase (BOORE, 1999) (Figura 5).

Figura 5. Esquema da molécula de mtDNA mostrando as diferentes regiões que a compõe.



Fonte: (Ilustração: jhc public domain,). Google.

Dentre os marcadores mitocondriais, o mais utilizado em estudos genéticos com artrópodes é o gene citocromo C oxidase subunidade I (COI). A elevada taxa evolutiva geralmente apresentada permite que ele seja usado em vários tipos de estudos, incluindo filogeografia e DNA Barcode (BUENO-SILVA, 2012). O gene COI é o maior e mais conservado do mtDNA (BEARD et al., 1993), e codifica uma proteína responsável pela catálise envolvida no transporte de elétrons e a translocação de prótons através da membrana (SARASTE, 1990). Seu uso como marcador molecular deve-se à junção de regiões nucleotídicas altamente conservadas com outras mais variáveis (SARASTE, 1990; GENNIS, 1992).

A informação genética desses marcadores é obtida por meio do sequenciamento de fragmentos de DNA. Atualmente, o sequenciamento de DNA é o método que oferece maior nível de resolução para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (BUENO-SILVA, 2012).

Na classe Insecta muitos genomas mitocondriais completos já estão disponíveis em bancos de dados, possibilitando a utilização de diversas sequências nucleotídicas ou de aminoácidos para a resolução de problemas filogenéticos (HUA et al., 2009).

### 2.3.2 Extração e Amplificação de DNA

A obtenção de sequências nucleotídicas para análises moleculares é proveniente de sucessivas etapas fundamentais. Inicialmente torna-se necessário a aplicação de métodos eficientes para extração e purificação do DNA. De acordo com Oliveira et al. (2007), o método mais comum para obtenção de DNA é a extração com fenol tamponado (pH próximo a 8,0) e clorofórmio, que provocam a desnaturação das proteínas contidas na amostra de maneira eficiente.

Os procedimentos de extração e purificação de ácidos nucleicos são indispensáveis para o bom desempenho de ampliações em métodos que utilizam a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que por sua vez baseia-se na hibridização (“annealing”) e na extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”), que delimitam a região que deve ser amplificada. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências nucleotídicas sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo.

Através dessa técnica torna-se possível amplificar *in vitro* regiões específicas de qualquer genoma. Ela foi desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), mas descrita por Saiki et al. (1985), e impulsionou positivamente diversas pesquisas sobre biologia molecular. Através da sua especificidade, vários segmentos do genoma podem ser copiados ainda que as amostras sejam heterogêneas, tornando-se eficiente em análises sobre diversidade genética de populações e estudos evolutivos. As reações possibilitam que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética (OLIVEIRA et al., 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

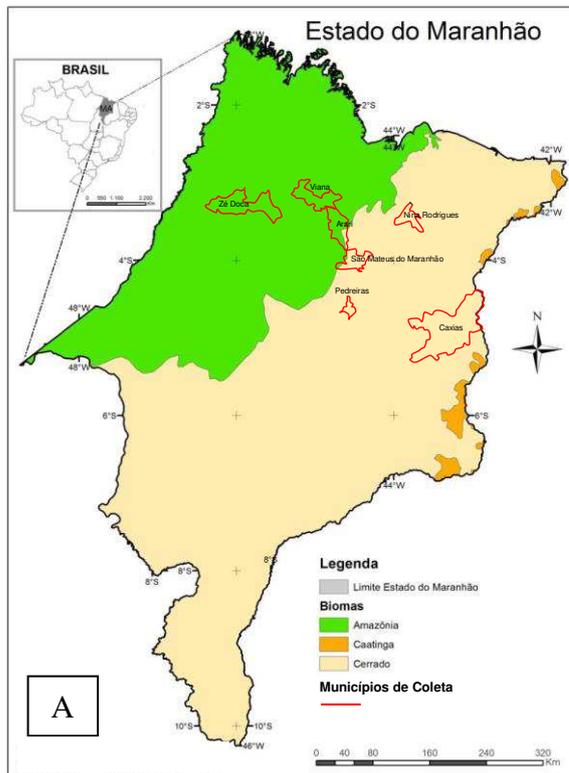
O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Entomologia, do Núcleo de Biotecnologia Agronômica, no LABWICK/UEMA (Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr”), no LABGEM/UFMA (Laboratório de Genética e Biologia Molecular) e no GENBIMOL/UEMA (Laboratório de Genética e Biologia Molecular em Caxias - MA).

#### 3.1 Descrição das áreas de coleta - Caracterização dos Biomas e municípios

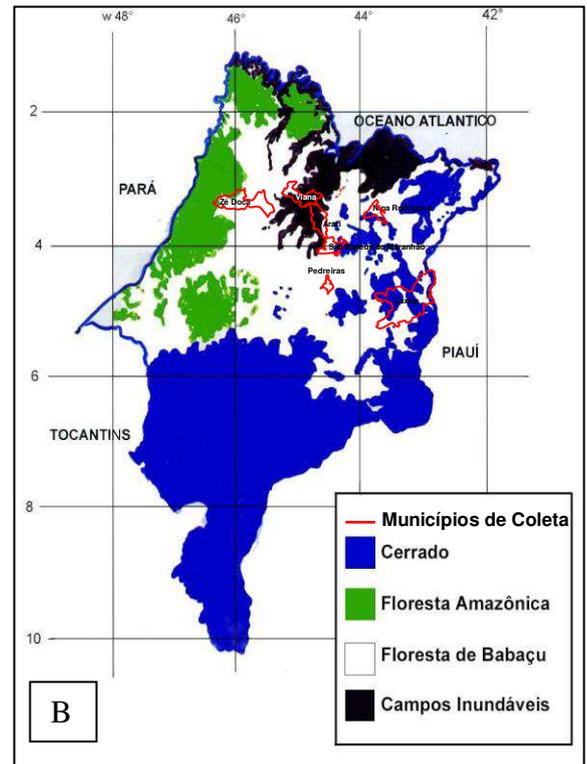
Espécimes de *T. limbativentris* foram coletados em plantios de arroz em sete municípios maranhenses distribuídos em diferentes biomas. De acordo com o IBGE (2004), o Maranhão apresenta três biomas definidos: Amazônia, Caatinga e Cerrado. Contudo, por sua extensão territorial e confluência desses biomas, o estado apresenta também outras formações peculiares e típicas como Mata dos cocais (transição) e Baixada, caracterizando o estado no âmbito nacional como uma área de grande diversidade animal e vegetal (AB´SABER, 1977; MUNIZ, 2006; DIAS et al., 2009).

Para Walter (1986), o bioma é tido como um ambiente em que são considerados não apenas o clima, mas a altitude, as características de solo e ainda a presença de fogo natural. Esse conjunto reflete diretamente no estabelecimento e composição florística e faunística das regiões (COUTINHO, 2006). Os municípios de coleta pertencem aos biomas Amazônia ou Floresta Equatorial (Zé Doca), Mata de transição (São Mateus e faixa de Caxias), Baixada (Arari e Viana) e Cerrado (Nina Rodrigues e Pedreiras) (Figura 6), e pertencem a diferentes formações geológicas, mas principalmente a Formação Itapecuru que é caracterizada por dificuldades de aeração no solo e deficiências nutricionais (MOURA, 2006).

Figura 6. Municípios de coleta dos espécimes de *Tibraca limbativentris* em seus respectivos Biomas segundo o IBGE (2004) (A) e Muniz (2006) (B).



Fonte: Adaptado de MMA, IBGE (2004).  
Sistema de Coordenadas Geográfica, Datum WGS84.



Fonte: Adaptado de MUNIZ (2006).

Os biomas em questão apresentam particularidades próprias que refletem a variação climática local. As formas mais comuns de organismos que os classificam, geralmente são as vegetações distribuídas ao longo de extensas áreas geográficas (SOARES, 2012).

A floresta Amazônica maranhense é caracterizada por abranger uma diversidade de climas e solos, e a história do uso dessas terras reflete na diversidade de vegetação, representadas por matas de cipós nas áreas mais úmidas, e matas secas (pluviosidade menor), de caráter semidecidual, mais abertas e com maior densidade de palmeiras, como babaçu (*Attalea speciosa*) e bacaba (*Oenocarpus* spp) (MUNIZ, 2006).

A Amazônia maranhense ocupa 26% de todo o bioma amazônico nacional, e encontra-se distribuída em 62 municípios do Maranhão, representando 34% do território do Estado (MIOTTO, 2012). Sabe-se, porém, que o Maranhão é o estado da Amazônia Legal que possui

o menor grau de ocupação do espaço com áreas protegidas (ARAÚJO; LOPES; FILHO, 2011). Juntamente com o Pará, Rondônia e Mato Grosso, o cenário é de degradação, que decorre, principalmente, em função do desmatamento, da falta de prática de manejo sustentável das áreas, das queimadas e da fragmentação do ecossistema, representando 90% do desmatamento de 2001 a 2003 (FERREIRA; VENTICINQUE, ALMEIDA, 2005). A degradação ambiental inclui a perda de biodiversidade, redução da ciclagem da água e nutrientes, redução da qualidade de vida, dentre outros (ARAÚJO; LOPES; FILHO, 2011).

O município Zé Doca, representante do Bioma amazônico, é uma cidade carente, tanto do ponto de vista econômico, como social e de recursos naturais. Do ponto de vista agrícola, não há zoneamento para identificação de áreas com aptidão para uso e ou para manutenção da biodiversidade. Os sistemas de cultivos de corte e queima e a bovinocultura são predatórios, pressionam a cobertura vegetal nativa com as queimadas e avançam com pastagens sobre as áreas de capoeira, restando atualmente apenas fragmentos de mata equatorial (FERNANDES; LEMOS; CARDOSO, 2012). A extração de madeira e as atividades agropecuárias são os fatores que mais pressionam os recursos ambientais, descaracterizando ecologicamente os ecossistemas originais e agindo na degradação, baixa fertilidade e produtividade da terra, com reflexos negativos sobre a qualidade de vida das famílias (DINIZ et al., 2009). A área de coleta caracteriza-se por longa extensão de lavoura consorciada em capoeira aberta e com alta densidade de *A. speciosa*, principal hospedeiro de *T. limbativentris* em período de diapausa, no Maranhão.

A Baixada Maranhense, ou campos inundáveis situa-se na porção centro-norte da área de transição entre a Amazônia e o Nordeste Brasileiro, composta por 21 municípios, sendo uma região de grande importância social e ecológica no estado (SILVA; MOURA, 2004). O pantanal maranhense, como também é conhecida, apresenta grande importância ecológica em virtude de suas planícies, que anualmente inundam pelo transbordamento de seus rios, trazendo vida e diversidade biológica. Apresenta também enorme importância social, pela ligação que os municípios da Baixada mantem pela exploração de recursos dos campos inundáveis (FARIAS FILHO, 2006). Os municípios de Viana e Arari representam as áreas de coleta inseridas nesse bioma e possuem características semelhantes de solo, clima e vegetação. Ambos apresentam em sua totalidade formações geológicas do tipo aluviões, caracterizados por depósitos de areia fina e silte, e ainda deposições de argila em virtude da inserção de águas marinhas em seus vales (BROWERS, 1977). Na agricultura, a

produtividade tende a cair, ainda que inicialmente ocorram experiências exitosas, mas insustentáveis no tempo em virtude das características intrínsecas ao solo e também pela ausência de práticas que assegure o crescimento e manutenção da qualidade desses solos (MOURA, 2006). O cenário atual são cultivos desenvolvidos por agricultores de porte econômico e tecnológico variados, em grandes extensões de terra (empresas e agricultores de grande porte, principalmente para o cultivo de arroz) e pequenas extensões de terra (agricultor familiar ou associados em cultivos geralmente consorciados no sistema corte-queima). As áreas de coleta nesses dois municípios são semelhantes, ambas possuíam vegetação e nível tecnológico similares (baixo nível) e alta densidade de *A. speciosa*.

O Cerrado maranhense corresponde a aproximadamente 40% do território do estado, apresentando várias formas de vegetação com diferentes tipos estruturais, relacionados, principalmente, a um gradiente de biomassa (MUNIZ, 2006). Por se tratar de uma região ecotonal, o Cerrado maranhense apresenta grande heterogeneidade com manchas de Caatinga na sua porção leste, vegetação amazônica na região oeste e campos inundáveis na região central, além das restingas e manguezais (IBGE, 1984). A presença do fogo em áreas de Cerrado é um fator de forte impacto na diversidade de espécies, e a agricultura é propulsora nesse processo. Os municípios Caxias, Nina Rodrigues, São Mateus e Pedreiras se inserem no Bioma Cerrado, contudo suas características de solo e clima lhe conferem aptidões específicas para a agricultura. Caxias, por exemplo, destaca-se como uma das dez cidades maranhenses mais importantes na produção de cana-de-açúcar (SAGRIMA, 2016). O município está em uma faixa de clima seco e sub-úmido, e apresenta vegetação com características típicas do Bioma, mas possui manchas com densas faixas de *A. speciosa* e outras *Arecaceas*. São Mateus do Maranhão apresenta aptidão para o cultivo de arroz e Pedreiras destaca-se como importante produtor de banana e melancia (SAGRIMA, 2016). Nina Rodrigues destaca-se com atividades voltadas para a agricultura familiar com lavouras de arroz, feijão, milho e mandioca, principalmente (COELHO; MATOS JÚNIOR, 2012). O principal sistema de cultivo adotado é de corte e queima que é muito comum nos cultivos dos produtos (JARDIM; RIBEIRO; FARIAS FILHO, 2010).

### 3.2 Coleta de *Tibraca limbativentris*

Os espécimes de *T. limbativentris* foram coletados durante a safra (cultura instalada nos campos de produção) em áreas caracterizadas por possuírem baixa fertilidade natural em que predominava o sistema de corte e queima para o arroz de sequeiro.

A amostragem em campo foi realizada a partir da região central de cada área, com caminamento em “X”, cujos vértices distavam dez metros entre si. Em cada vértice, considerou-se cinco touceiras próximas para realização das coletas. Elas não possuíam a mesma distância, por se tratar de cultivos com semeadura a lanço. A média de espécimes coletados em cada vértice (representado pelas cinco touceiras) foi de 18 indivíduos adultos, contudo, para as análises considerou-se apenas 10 percevejos de cada município, totalizando 70 indivíduos adultos.

A triagem do material consistiu inicialmente na limpeza dos espécimes em água destilada, secagem delicada com papel toalha, sexagem, identificação das amostras e armazenamento dos indivíduos em etanol absoluto a temperatura de -20°C. A extração do DNA foi realizada com partes do tecido muscular presentes no abdômen e tórax dos insetos machos. As fêmeas foram desprezadas pelo fato de muitas delas estarem cheias de ovos possivelmente fecundados. A reprodução sexuada proporciona troca de material genético. Dessa forma, tentou-se evitar informações genéticas de mais de um indivíduo por amostra.

### 3.3 Isolamento e visualização do material genético – DNA

O material genético de cada exemplar foi isolado utilizando o protocolo de extração fenol-clorofórmio, seguido da precipitação por acetato de sódio e isopropanol (SAMBROOK et al., 2001). A musculatura foi isolada em tubos *ependorf*, com tampão de lise (600 µL) e proteinase K (15 µL), e submetidos a banho-maria (55°C) por duas horas para dissolver o tecido. A cada dez minutos realizou-se homogeneização manual para aumentar a eficiência do processo. Após esfriamento total dos tubos, pipetou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamilíco (25:24:1) (700 µL). Esse material foi manualmente homogeneizado (10 minutos) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O fenol-clorofórmio-álcool-isoamilíco fez a separação entre o DNA e outras moléculas celulares. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos, nos quais, adicionou-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamilíco (24:1) para nova

centrifugação (10.000 rpm a 10 minutos). Transferiu-se o sobrenadante formado para novos tubos com aplicação posterior de acetato de sódio (100 µL) e isopropanol (700 µL) para a precipitação do DNA. Com a formação do *pellet*, congelou-se os tubos por aproximadamente 24 horas. Após permanência no frio, centrifugou-se os tubos por 10 minutos a 10.000 rpm para separação do sobrenadante, que foi descartado. O *pellet* permaneceu no interior do *eppendorf*. Realizou-se uma nova centrifugação (10.000 rpm a 5 minutos) com etanol 70% (500 µL). O álcool foi descartado e o DNA foi colocado para secar em estufa (37° C) e dissolvido em TE (50 µL).

Para a verificação dos resultados da extração foram feitas corridas das amostras de DNA em eletroforese horizontal a 80 V e 90 mA por 30 minutos em tampão de corrida TBE, utilizando gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, que foi posteriormente visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. O DNA foi quantificado em NanoDrop® 1000 - Thermo Scientific™ para determinação da concentração de DNA (ng/µL). Nessa etapa realizou-se a homogeneização dos *eppendorfs* em microcentrifuga para posterior leitura. Amostras com altas concentrações de DNA foram diluídas em água ultra-pura na proporção 1:1 e novamente quantificadas.

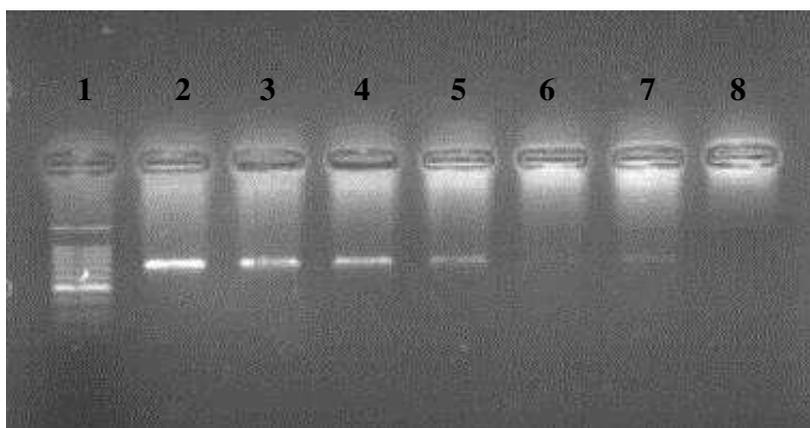
### 3.4 Amplificação do gene COI por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As amplificações das sequências da região mitocondrial do gene COI foram realizadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador Veriti 96-Well (*Applied Biosystems*) a partir de amostras padronizadas. A padronização consistiu na realização de testes para adequação de volumes e temperaturas ideais para amplificação do gene COI. No preparo do mix de PCR, considerou-se o volume final de 25 µL contendo os seguintes reagentes: H<sub>2</sub>O ultra - pura (13,8 µL), DNTP (0,5 µL) a 1 mM, *Buffer* (5 µL), MgCl<sub>2</sub> (2,5 µL) a 25 mM, *Taq polymerase* (0,2 µL), DNA (2 µL) e 0,5 µL de cada iniciador (*primers*) a 10 mM. Os *primers* utilizados nas reações foram: HCO-L 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' e LCO-L 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (FOLMER et al.,1994).

As condições para amplificação do segmento do gene mitocondrial COI consistiram em uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para a desnaturação (separação) da dupla fita de DNA, 1 minuto a 48°C para o *annealing* dos iniciadores e 1 minuto a 72°C para a extensão realizada pela enzima *Taq polymerase*. Ao final

da reação foi feita uma etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C. Uma alíquota de 5 µL de cada amostra de PCR foi aplicada em gel de agarose 1% (60 V, 270 A e 40 min.) para confirmar a amplificação. A expressividade e definição visível das bandas é um indicativo da qualidade das futuras sequências (ZATS, 2015). A visualização de uma banda íntegra, confirmou a amplificação do segmento desejado (Figura 7).

Figura 7. Visualização das bandas em teste realizado para definir temperatura de anelamento ideal para o COI em uma mesma amostra (1- Lader; 2- 48°C, 3- 50°C, 4- 52°C, 5- 54°C, 6- 58°C, 7- 56°C, 8- controle negativo).



### 3.5 Purificação e sequenciamento

O processo de purificação das PCRs consistiu em isolar somente o fragmento amplificado, eliminando qualquer outro componente da reação que tenha permanecido na solução final. A purificação foi realizada adicionando-se 1,87 µL de água, 3 µL de DNA e 0,13 µL do Kit ExoSAP-IT. Os purificados foram submetidos a uma nova reação de PCR pelo método didesoxiterminal (SANGER et al., 1977), com reagentes do Kit *Big Dye* (*ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction - Perkin Elmer*) (Tabela 1). Após nova PCR, as amostras foram submetidas a sucessivas etapas de centrifugação com etanol e EDTA para precipitação da reação de sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi efetuado em ambas as fitas de DNA no sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems*) na Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, Campus Caxias.

**Tabela 1.** Especificações das reações de sequenciamento desenvolvidas em amostras de *Tibraca limbativentris*.

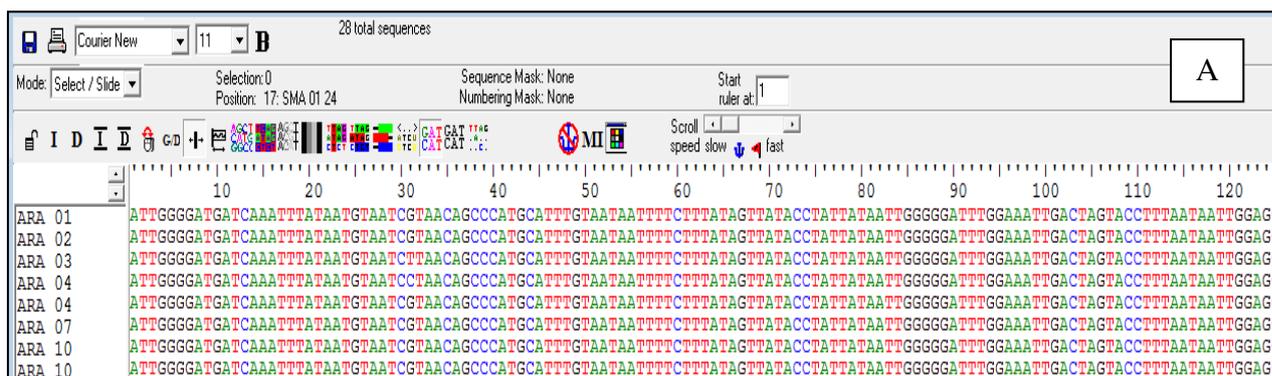
| Reação de Sequenciamento |          | Programa de Amplificação para reação de seqüência |        |                        |
|--------------------------|----------|---|--------|------------------------|
|                          | Vol (µL) |   | T - °C | Tempo                  |
| Água                     | 3,5      | Desnaturação inicial                              | 96     | 1 minuto               |
| Buffer                   | 1,5      | Desnaturação                                      | 96     | 15 segundos/35 ciclos  |
| Prime (0,8 pmol/µL)      | 2        | Anelamento  | 50     | 15 segundos/35 ciclos  |
| DNA purificado           | 2        | Extensão  | 60     | 2:30 minutos/35 ciclos |
| <sup>1</sup> Big Dye     | 1        |   | 4      | ∞                      |

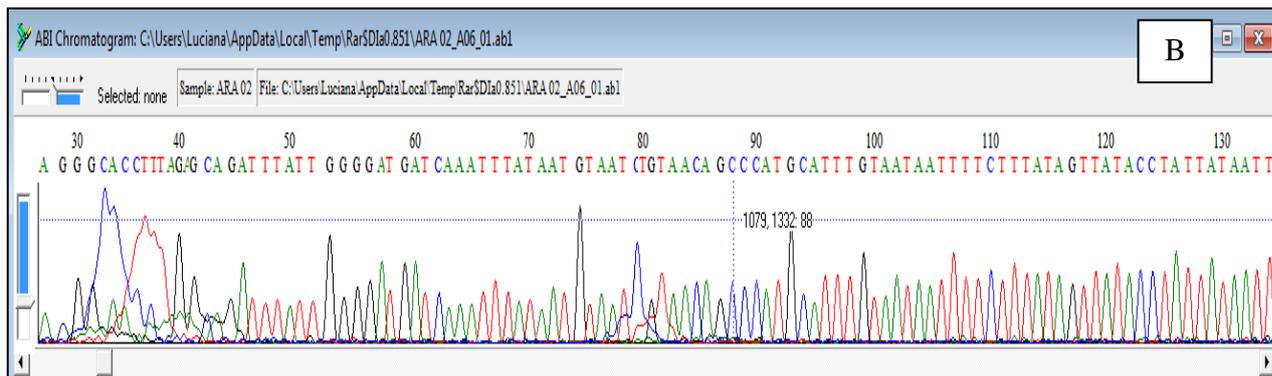
<sup>1</sup> Big Dye Kit contém: dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> e tampão Tris-HCl.

### 3.6 Análises das seqüências

As seqüências de COI foram alinhadas e editadas pelo Software Bioedit (HALL, 1999), a partir de réplicas e das seqüências *Forward* e *Reverse* (Figura 8). As bases do alinhamento foram avaliadas de acordo com sua qualidade, eliminando-se parte do começo e fim das seqüências, que, em geral, apresentam baixa qualidade de sequenciamento. A edição consistiu em verificar “pontos conflitantes” e confirmar possíveis mutações expressas nas seqüências.

Figura 8: Fragmentos de seqüências de espécimes de *Tibraca limbativentris*. Alinhamento (A); Edição conforme necessidade nos gráficos de seqüência (B).





Como grupo externo, foram usadas sequências de espécies neotropicais da família Pentatomidae provenientes da plataforma do GenBank (Tabela 2).

**Tabela 2:** Sequências utilizadas como grupo externo para análise de filogenia.

| <b>Pentatomidae:<br/>Espécies</b> | <b>Cidade/UF/país</b> | <b>Código no<br/>Genbank (COI)</b> | <b>Similaridade</b> |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|
| <i>T. limbativentris</i>          | MA/Brasil             | -                                  | Deste estudo        |
| <i>Dichelops melacanthus</i>      | EUA                   | JQ218458                           | 86%                 |
| <i>Acrosternum hilare</i>         | Canadá                | KU601551<br>KU601550               | 86%                 |
| <i>Piezodorus guildinii</i>       | Brasil                | JX548501<br>JX548496               | 87%                 |

Os alinhamentos foram submetido a testes para verificar a qualidade da informação filogenética das sequências. Estes testes possibilitaram a verificação da saturação, ou seja, ocorrência de múltiplos eventos mutacionais no mesmo sítio nucleotídico, que apagam a história evolutiva e o sinal filogenético. A verificação da presença de saturação nas sequências foi realizada pela plotagem em gráfico da divergência nucleotídica *versus* transições (Xs) e transversões ( $\Delta v$ ) utilizando o programa DAMBE v5.2.18 (XIA, 2017).

As estimativas de razão entre transições e transversões servem para determinar as probabilidades dos diferentes eventos de substituição. Mutações por substituição de bases

(transição e transversão) sugerem a ocorrência de grupos que podem se dividir filogeneticamente ao longo do tempo. Essas mutações ou substituição de bases são mutações de pequena escala que podem levar à substituição de um aminoácido por outro na cadeia polipeptídica resultante da troca de uma única base no polímero de ácido nucleico, ou seja, em um único ponto do gene. O que ocorre é que códons com pirimidinas e códons com purinas codificam aminoácidos específicos. Se houver substituições de uma base pirimídica por outra (U/C ou C/U) ou de uma base púrica por outra (A/G ou G/A), ocorrem mutações de transição, mas quando bases pirimídicas são substituídas por púricas, ou vice-versa, ocorrem mutações de transversão.

Outro método empregado para verificação da saturação e do sinal filogenético foi utilizando-se o modelo de substituição e composição nucleotídica. O modelo de substituição nucleotídica fornece o grau de transição e transversão, ou seja, substituição de purinas e pirimidinas nos processos de mutação. Esse fato fortalece o sinal filogenético. Já a composição nucleotídica fornece o percentual de cada base nitrogenada nas sequências de DNA, considerando-se as médias percentuais da região de coleta. Os métodos foram realizados pelo programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Com o programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER, 2006) determinou-se a diversidade haplotípica ( $h$ ) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

A rede de haplótipos foi construída pelo cálculo de *Median joining* utilizando as frequências haplotípicas do marcador no grupo analisado por meio do programa Network 5.1 (BANDELT et al., 1999), para as sequências de *T. limbativentris*.

A divergência entre as sequências foi calculada baseando-se em um modelo de evolução que determina como as diferenças se acumulam, inferindo a quantidade de mutações ocorridas a partir da separação destas (MEYER, 1995). Nesta análise, foi utilizado o método de Tamura e Nei (1993), uma vez que seu algoritmo é classicamente usado para o cálculo de distâncias a partir de sequências nucleotídicas de genes mitocondriais. Duas análises foram desenvolvidas: a distância intrapopulacional e a distância interpopulacional.

Para verificação de possíveis agrupamentos genéticos entre os indivíduos utilizou-se o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) na construção de árvore filogenética pelo método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*). Ele é baseado em matrizes de

distância, de acordo com princípios da evolução mínima, que escolhe a topologia que apresenta a menor soma de comprimentos de ramos. Esse método utiliza comparações par a par entre distâncias (número de mutações) das sequências. A confiabilidade dos ramos foi testada pela análise de *bootstrap* utilizando 1000 replicações. Foram considerados significantes os valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 95%, como sugerido por Schneider (2003).

Para analisar se as populações estão em expansão, com o programa Arlequin aplicou-se os testes  $D$  e  $F$  (FU; LI, 1993) e  $D$  (TAJIMA, 1989) de neutralidade com 10.000 permutações. Esses índices têm seu cálculo baseado na distribuição de sítios segregantes e na diversidade nucleotídica. A história demográfica de uma população deixa uma assinatura no genoma de seus representantes atuais. A reconstrução dessa história pode levar a conclusões úteis sobre vários processos evolutivos (ZOLET et al., 2013). Os testes de neutralidade são utilizados para testar a ausência de seleção em um conjunto de dados. Eles analisam a influência das mutações sobre a história de vida das populações. A hipótese nula utilizada por esses testes inclui tamanho populacional constante e população não estruturada. Assim, utilizando um marcador supostamente neutro, esses testes podem indicar decréscimo, expansão ou estabilidade populacional (NIELSEN, 2001).

O índice de *raggedness* (HARPENDING, 1994) entre a distribuição observada e esperada também foi utilizado como teste estatístico para analisar o modelo de expansão estimado pelos testes de Fu e Tajima. Populações em expansão exibem baixos valores de *raggedness*, enquanto, o contrário é observado em populações estáveis ao longo do tempo (HARPENDING, 1994).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características moleculares

De um total de 70 amostras cuja extração de DNA foi exitosa, obteve-se resultados positivos na amplificação do gene COI para 33 amostras, que posteriormente foram sequenciadas. Desse total, apenas 27 foram utilizadas no estudo por apresentarem sequências mais longas (685 pb em média) e de melhor qualidade (Tabela 3).

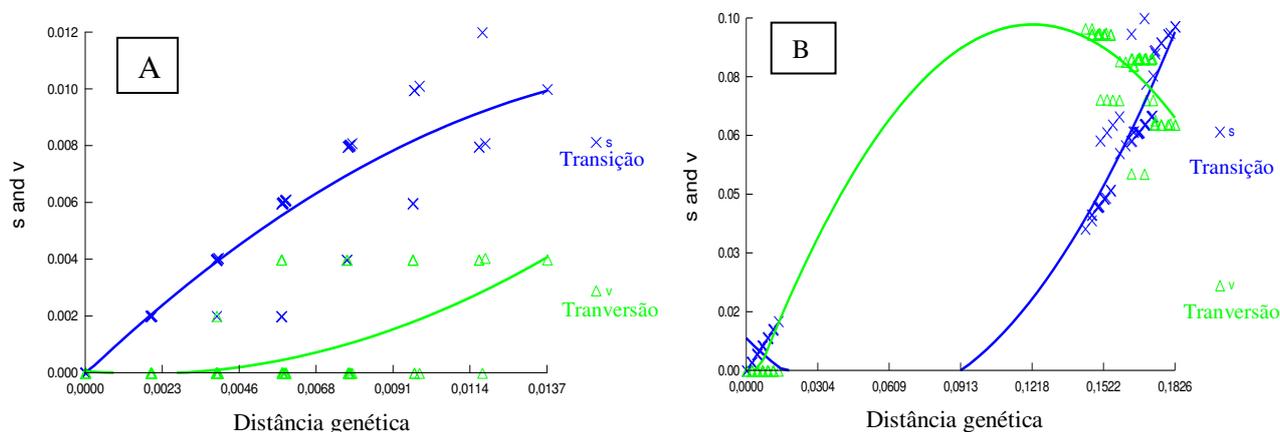
**Tabela 3:** Codificação das sequências de *Tibraca limbativentris* por município do estado do Maranhão.

|       | Zé Doca | São Mateus | Pedreiras | Viana | Arari  | Nina Rodrigues | Caxias |
|-------|---------|------------|-----------|-------|--------|----------------|--------|
| C     | ZDA01   | SMA01      | PE04      | VI02  | ARA01  | NR02           | CA03   |
| Ó     | ZDA04   | SMA02      | PE13      | VI08n | ARA02  |                | CA09   |
| D     | ZDA09   | SMA03      | PE15      | VI10  | ARA03  |                | CA13   |
| I     |         | SMA04      |           |       | ARA04  |                | CA14   |
| G     |         | SMA06      |           |       | ARA04n |                |        |
| O     |         | SMA07      |           |       | ARA07  |                |        |
| S     |         |            |           |       | ARA10  |                |        |
| Total | 3       | 6          | 3         | 3     | 7      | 1              | 4      |

Após alinhamento e edição as sequências ficaram com 519 pb para os 27 representantes de *Tibraca limbativentris* (grupo interno) mais as sequências do grupo externo (outras espécies de Pentatomidae).

O gráfico de saturação das sequências demonstra sinal filogenético para o gene COI em relação ao polimorfismo das sequências de *T. limbativentris*. Elas não apresentaram indícios de saturação entre as transições (Xs) e transversões ( $\Delta v$ ) (Figura 9A). Caso houvesse saturação dos dados (Figura 9A), seria esperado que o número de transições observadas em relação ao número de transversões decrescesse na proporção que a taxa de divergência aumentasse (ARAÚJO, 2011).

Figura 9: Gráfico de transição (s) e transversão (v) *versus* divergência nucleotídica das sequencias do gene COI. (A) Grupo interno; (B) Grupo interno e Grupo externo.



Contrariamente, a relação entre os parâmetros apresenta-se de forma não linear, demonstrando que com o aumento da distância há o decréscimo de transições e/ou transversões (Figura 9B). Conclui-se que o sinal filogenético é fraco apesar da similaridade entre *T. limbativentris* e demais espécies do grupo externo. Isso sugere que o polimorfismo do COI não apresenta sinal filogenético para se fazer uma reconstrução filogenética das relações entre o grupo interno e o grupo externo. A saturação de substituição de nucleotídeos pode diminuir o potencial das características filogenéticas informativas, diminuindo assim a consistência filogenética (COGNATO; SPERLING, 2000). De acordo com Fonseca e Pinto (2017), para que espécies sejam chamadas de espécies separadas filogeneticamente, as populações devem ter sido independentes por tempo suficiente para garantir características distintas e unificadoras, sejam estas de caráter estrutural, bioquímico ou molecular.

O conteúdo GC foi de 35,2%, menor que o conteúdo AT. Valores em que o percentual de bases AT foram superiores as GC também foram registradas por Banho (2016) com os genes mitocondriais 16S (72,3 % AT e 51,4% GC) e ND5 (75,4 % AT e 24,6% GC) aplicados em 17 espécies de pentatomídeos e uma de Coreídeos. Sousa (2013) obteve valores bem próximos para o percentual AT (64,1%) em estudo desenvolvido para a mesma região do COI em 14 espécies de Pentatomídeos. Nesse mesmo estudo, a média do percentual AT apenas no codon 3 do gene COI foi de 80%. Segundo o autor, valores elevados podem levar à análise filogenética inconsistente em táxons superiores. Geralmente, uma composição maior de AT é uma característica comum do DNA mitocondrial de insetos (SIMON et al., 1994).

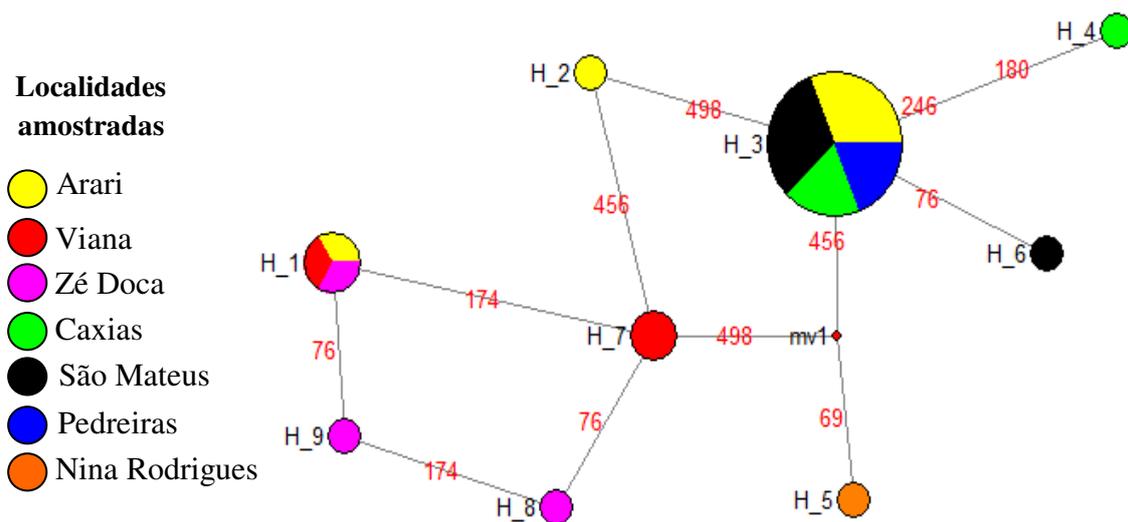
A taxa estimada de transição/transversão (Ts/Tv) do gene COI para as populações de *T. limbativentris* foi de 11,03, enquanto que nos Grupos Interno/Externo foi 1,19. Razões de substituições de nucleotídeos iguais ou superiores a 1,0 sugerem que há maior número de mutações de transição ocorrendo em comparação a transversões para essas sequências (MATIOLI, 2004). Esses valores são inferiores aos registrados por Banho (2016) com os genes mitocondriais 16S e ND5, porém superiores aos registrados por Li et al. (2012) com os genes mitocondriais 16S e COI que apresentaram Ts/Tv de 0,5 e 0,7, respectivamente, e por Tian et al. (2008), que apresentaram Ts/Tv de 0,5 para o gene mitocondrial 16S. Quando marcadores gênicos apresentam baixa razão (Ts/Tv), isso indica que a quantidade de transversões é superior às transições, e que o gene em questão evolui de forma mais lenta em comparação com outros. Contudo, esse fato é muito mais comum em genes nucleares do que em genes mitocondriais, pois aqueles acumulam menores quantidades de mutações no tempo (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

O número de sítios variáveis foi igual a sete, com sete mutações, o que gerou nove haplótipos para *T. limbativentris* coletados no Maranhão. A diversidade haplotípica foi de 0,65, a diversidade nucleotídica 0,0031, e o número médio de diferenças nucleotídicas em relação aos haplótipos encontrados foi de 1,5. Esses parâmetros são importantes, uma vez que a variabilidade e a diversidade genética são altamente necessárias para a continuidade evolutiva e determiná-las pode, entre outras coisas, demonstrar o quanto organismos podem adaptar-se a novos ambientes e/ou condições. Apesar das amostras apresentarem baixa diversidade nucleotídica, o valor aqui encontrado para a diversidade haplotípica foi alto, indicando que esses indivíduos apresentariam até o momento, boa capacidade de se adaptarem a novas pressões seletivas, tais como mudanças climáticas ou mudanças na disponibilidade de recursos, ou ainda pressões mais pontuais, como aplicação de métodos específicos de controle. Com o tempo essas pressões poderiam aumentar ou diminuir a diversidade. Pesquisas desenvolvidas em artrópodes utilizando marcadores mitocondriais registraram valores semelhantes. Baggio (2010) registrou diversidade haplotípica (0,719) e diversidade nucleotídica (0,00145) para 21 sequências de espécimes de Crisopídeos provenientes de seis localidades, com o gene COI. Vendrami (2017) registrou diversidades nucleotídicas (0,00342 a 0,00817) e diversidades haplotípicas (0,634 a 0,819) em alguns exemplares de triatoneos (Hemiptera: Reduviidae) utilizando o marcador mitocondrial CitB, demonstrando também que os mesmos podem apresentar maior chance de se adaptarem no meio em que vivem. Os

indivíduos de *Tibraca* são muito próximos geneticamente e essa diversidade pode contribuir para sistemas de manejo, pois se, o ambiente em que vivem naturalmente sofrer alguma mudança importante, sua variabilidade torna a população capaz de lidar com essas mudanças. Geralmente, na natureza, quando alguma espécie ou populações são extintas, o fator que mais contribui é a redução na variabilidade genética.

A rede de haplótipos mostrou o haplótipo H3 como mais frequente e ocorrendo em quatro das sete localidades amostradas. Houve também haplótipos exclusivos, ou seja, somente encontrados em uma determinada localidade, indicando alguma diferenciação ainda incipiente. Contudo, todas as populações apresentaram ao menos um haplótipo compartilhado com outra população, exceto para Nina Rodrigues, mas isso provavelmente decorre da amostragem pouca representativa com apenas um indivíduo. Então o padrão mostrado pela rede de haplótipo é de uma população geneticamente homogênea para o marcador mitocondrial COI (Figura 10).

Figura 10: Rede de haplótipos de *median joining* das sequências de COI de *Tibraca limbativentris* no estado do Maranhão.



Matrizes de divergência nucleotídica podem sugerir o quanto os indivíduos estão distantes ou próximos evolutivamente. As distâncias genéticas entre as amostras do Maranhão tiveram média de 0,41%, variando de zero entre PE e SMA a 0,8% entre ZDA e CA. Em

relação aos grupos externos, as divergências em relação a *T. limbativentris* foram maiores do que 14% (Tabela 4). Essas baixas distâncias genéticas interpopulacionais reforçam o resultado de homogeneidade genética no COI para *T. limbativentris* do Maranhão.

Tabela 4: Estimativas de divergências genéticas pareadas (Kimura 2-parâmetros) para as amostras de *Tibraca limbativentris* coletadas no Maranhão e os grupos externos.

|                              | ARA           | CA           | NR    | PE          | SMA          | VI           | ZDA          |
|------------------------------|---------------|--------------|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| ARA                          | <b>0,002*</b> |              |       |             |              |              |              |
| CA                           | 0,002**       | <b>0,002</b> |       |             |              |              |              |
| NR                           | 0,005         | 0,005        | -     |             |              |              |              |
| PE                           | 0,001         | 0,001        | 0,004 | <b>0,00</b> |              |              |              |
| SMA                          | 0,001         | 0,001        | 0,004 | 0,000       | <b>0,001</b> |              |              |
| VI                           | 0,004         | 0,006        | 0,005 | 0,005       | 0,005        | <b>0,001</b> |              |
| ZDA                          | 0,006         | 0,008        | 0,007 | 0,007       | 0,007        | 0,002        | <b>0,003</b> |
| <i>Dichelops melacanthus</i> | 0,161         | 0,160        | 0,166 | 0,161       | 0,161        | 0,163        | 0,163        |
| <i>Acrosternum hilare</i>    | 0,158         | 0,158        | 0,162 | 0,159       | 0,160        | 0,156        | 0,157        |
| <i>Piezodorus guildinii</i>  | 0,148         | 0,149        | 0,151 | 0,149       | 0,149        | 0,148        | 0,149        |

ARA- Arari, CA- Caxias, NR- Nina Rodrigues, PE- Pedreiras, SMA- São Mateus, VI- Viana, ZDA- Zé Doca

\*Valores em negrito indicam distâncias intrapopulacionais (entre os indivíduos de uma mesma região de coleta); \*\*Os demais são distâncias interpopulacionais (entre as diferentes populações).

Valores baixos de divergência ou distância genética indicam que todos os indivíduos (sejam eles da mesma região de coleta, ou de regiões distintas) compartilham quase que completamente do mesmo material genético. As amostras do Maranhão compartilham quase 100% do mesmo material genético, enquanto que as outras espécies compartilham em média 84,35% de material genético com *T. limbativentris*.

Para as amostras do Maranhão, a compreensão dessa escala mínima de divergência pode ser atribuída a variabilidade gênica que é muito importante em processos evolutivos de espécies. Muitos fatores podem ser atribuídos a isso, dentre eles processos migratórios ou de dispersão. Uma vez que indivíduos se inserem ou sejam inseridos em um grupo populacional, a tendência é que eles se tornem adaptados a semelhantes ou diferentes localidades e/ou condições, demonstrando suas habilidades de sobrevivência e manifestando comportamentos comuns e suplementares aos vigentes. Caso ocorra compatibilidade na reprodução desses

indivíduos dentro do habitat, seus genes poderão ser transmitidos aos seus descendentes e assim sucessivamente dentro da população. Dessa forma, gradativamente o fluxo gera estabilidade gênica, proporcionando semelhanças e reduzindo as diferenças entre os organismos de uma mesma espécie em populações distintas.

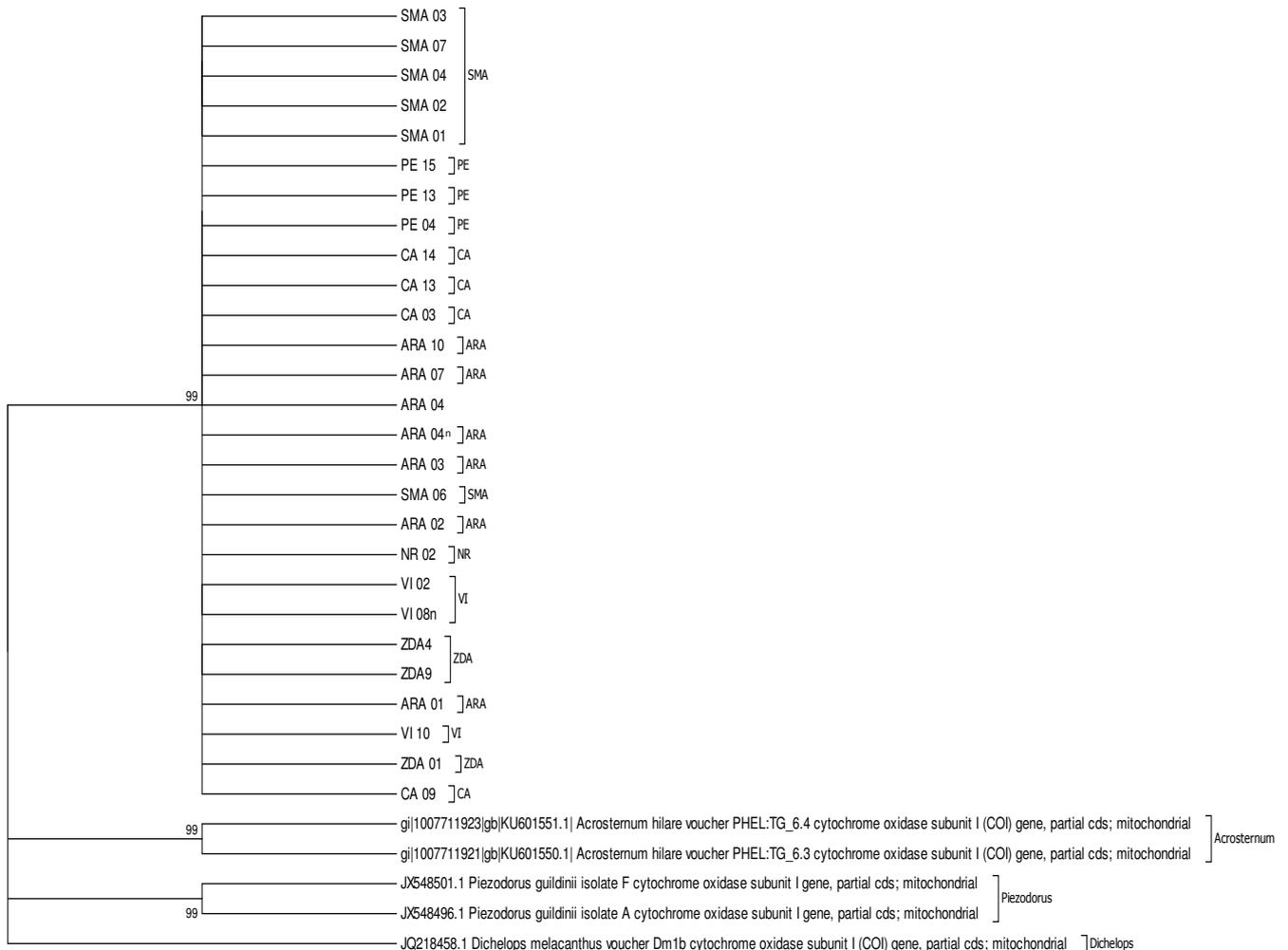
Souza-Firmino (2015) ao verificar a distância genética entre populações do percevejo *Pachycoris torridus* a partir do gene mitocondrial COI, verificou uma média de distância genética de 1,5%, contudo, a maior distância encontrada entre as populações analisadas foi de 2,5%. Smith-Caldas et al. (2001) ao analisarem 15 espécies de Diptera verificaram uma distância genética de 3,3%, evidenciando que valores acima de 3% são encontrados entre diferentes grupos taxonômicos.

Os valores de divergência genética também refletem dados de saturação filogenética. A saturação pode ocorrer em espécies que divergiram mais cedo em suas histórias evolutivas. Pechenik (2016) em estudo com diferentes espécies das famílias Coreidae e Pentatomidae, obteve valores de divergência que não excederam a 20% para os pentatomídeos, em especial, com um percentual de distância de 19,3% para o gene COI. Quando as espécies são irmãs, os valores de divergência geralmente são pequenos. Em estudos desenvolvidos com vários outros grupos de animais para o gene COI, as distâncias têm apresentado valores menores que 2% (KLICKA; ZINK, 1997; JOHNS; AVISE, 1998; HEBERT et al., 2004; WARD et al., 2005; YOO et al., 2006).

Com os valores de divergências genética, torna-se possível inferir relações filogenéticas não apenas para espécies de Pentatomídeos, mas também entre famílias diferentes. Se os valores forem próximos, conclui-se que o gene evoluiu de forma semelhante nas famílias analisadas.

A árvore filogenética utilizando o método de agrupamento de vizinhos (NJ), apresentou ramos com altos valores de *bootstrap*, garantindo confiabilidade. Ela demonstra que as amostras de *T. limbiventris* coletadas no Maranhão formam um único clado estatisticamente bem apoiada (99), confirmando os baixos valores de divergência genética (Figura 11).

Figura 11. Árvore de *Neighbor-joining* das sequências de COI de *Tibraca limbativentris* do estado Maranhão e Grupos Externos.



\*As letras representam as populações e os números são referentes à sua identificação na amostragem; ARA- Arari, CA- Caxias, NR- Nina Rodrigues, PE- Pedreiras, SMA- São Mateus, VI- Viana, ZDA- Zé Doca.

O fato dos indivíduos estarem agrupados dessa forma sugere que eles podem ser similares por questões de adaptação no habitat, forma de forrageio, adaptação aos microclimas, adaptação a inseticidas, não preferência alimentar ou reprodutiva e a outros fatores. A árvore também leva a considerar que, possivelmente, ocorre o fluxo gênico entre os indivíduos dessas populações. Coyne et al. (1982) afirma que a movimentação de genes pode fazer com que populações mesmo distantes se tornem geneticamente similares, conseqüentemente reduzindo as chances de especiação. Uma espécie vai evoluir em direções diferentes, se os indivíduos se tornarem reprodutivamente isolados ao longo do tempo

(PECHENIK, 2016). Quanto menor o fluxo gênico entre duas populações, maior a probabilidade de as duas populações evoluírem para duas espécies, o que não está ocorrendo entre as populações representadas pelos indivíduos de *T. limbativentris* que se encontram visivelmente similares, indicando migração e dispersão, por exemplo, que possuem caráter homogeneizante, limitando, impedindo ou retardando a diferenciação entre as populações (MELO, 2012).

A abordagem ecológica pode contribuir para entender esse padrão de distribuição exposto na árvore (Figura 11). De acordo com Tauber et al. (1986) e Kostal (2011), as populações de insetos variam no tempo e no espaço, sob a influência de fatores ecológicos, bióticos e abióticos. Fatores bióticos podem induzir processos como a dispersão em busca de alimento, enquanto que fatores abióticos podem induzir movimentos de migração regulados por variações dos elementos climáticos, em determinada época do ano, como a emigração para sítios de hibernação.

Para as populações de *Tibraca* deste estudo, a migração e o fluxo gênico entre os indivíduos pode ser atribuída a vários fatores, tais como dispersão humana direta ou indireta (causada principalmente pelo sistema de cultivo adotado pelos agricultores, corte-e-queima, que estimula a migração dos insetos a cada safra para diferentes áreas de cultivo), ciclo das cultivares, ausência de barreiras geográficas drásticas, áreas de coleta relativamente próximas, alta densidade de *A. speciosa* em todas as áreas de coleta, que é o principal refúgio do inseto para diapausa, etc. Características peculiares de cada área de coleta como clima, precipitação, solo, etc., parecem ter sido insignificantes no estabelecimento e adaptação dos indivíduos. Isso demonstra habilidades de sobrevivência do inseto a diferentes condições estabelecidas, adequação aos habitats e nichos ecológicos e manifestação de comportamentos afins e suplementares aos indivíduos já adaptados a cada um. Esse fato também leva a considerar que a espécie *T. limbativentris* pode ser facilmente adaptável a diferentes condições, tendo em vista sua ocorrência em diversos estados produtores de arroz presentes nas cinco regiões do país e em outros países da América do Sul. A distribuição espacial é um fator interessante para compreensão da dispersão dos insetos dentro das populações de espécies pois considera características ecológicas (BINNS et al., 2000) e poderia ser uma fonte de estudo interessante para compreender a forma com que se dá a diferenciação genética dentro e entre populações.

A similaridade genética entre populações, influenciada pela troca de genes entre seus indivíduos, pode fomentar a resistência dos mesmos a inseticidas e compostos variados ou

ainda superar a resistência de variedades. Os insetos, em especial, possuem ciclo de vida relativamente curto e os diferentes sistemas adotados em produções agrícolas podem atuar seletivamente sobre as populações, gerando conseqüentemente diferenças no padrão genético e biológico dos indivíduos. Esse fato pode provocar muitos problemas, principalmente relacionados à resistência de pragas a inseticidas (CRUZ, 2002).

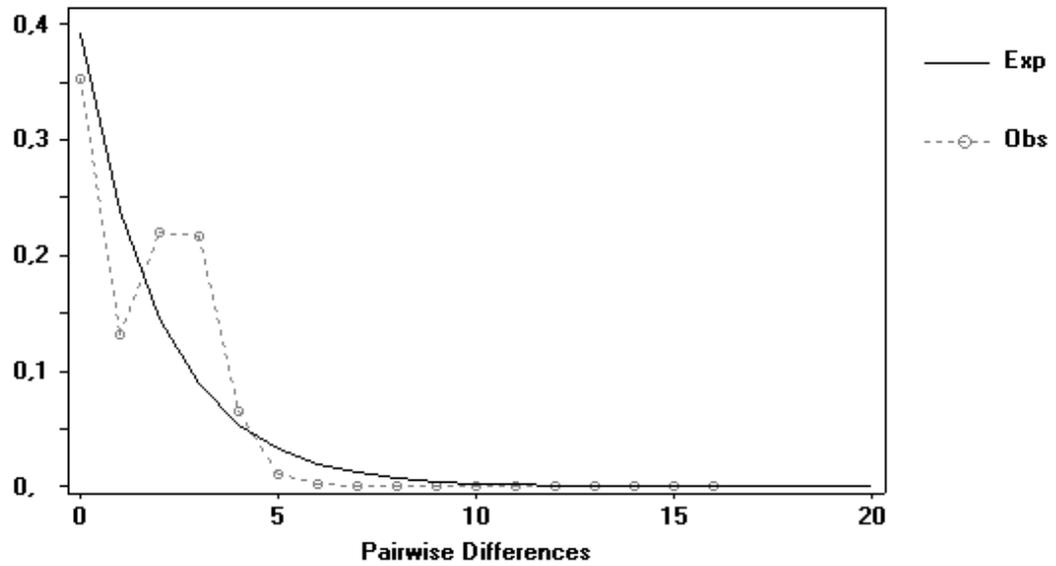
De acordo com Moreira et al. (2012), a resistência é tida como fator de desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de algum organismo para tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie. Para Li (2007), a resistência é um fenômeno estritamente genético, com mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo. Nesses casos, a pressão de seleção (deposição constante de químicos) atua pontualmente no surgimento de indivíduos mais fortes e com características herdadas das espécies de insetos envolvidas (HEMINGWAY; RANSON, 2000). A genética evolutiva configura-se como uma ferramenta importante para retardar ou impedir a evolução da resistência por meio do manejo integrado criterioso combinando químicos e não-químicos, como a utilização de inimigos naturais e a implantação de variedades resistentes em agroecossistemas diversificados, pois quando o cultivo se generaliza, os insetos adquirem maior capacidade de atacá-los, superando sua resistência e impulsionando o desenvolvimento de novas linhagens (FUTUYMA, 2002).

## 4.2 Análise demográfica

Considerando os municípios de coleta como um único grupo, os testes de neutralidade de Tajima's  $D$  (-43497),  $F_u$  e Li's  $D^*$  (-0,75603) e  $F_u$  e Li's  $F^*$  (-0,76905) não foram significativos ( $p > 10$ ). Valores negativos de  $D$  sugerem expansão populacional ou seleção purificadora (TAJIMA, 1989). Na curva de distribuição (análise de *mismatch distribution*), a linha contínua (curva esperada) indica tamanho de população constante e a linha tracejada indica a curva observada. A análise (*Raggedness statistic*  $r$ : 0,0830 Ramos-Onsins and Rozas,  $R_2$  statistic: 0,1122) não se encaixou num modelo de tamanho constante (Figura 12). Todos esses elementos e os baixos valores de *raggedness*, indicam um modelo de expansão recente. A rede de haplótipo com formato de estrela (Figura 10), evidencia que a partir do haplótipo de alta frequência surgem haplótipos derivados com poucos passos mutacionais, reforçando também uma expansão populacional recente, que pode estar relacionada ao cultivo do arroz,

que filogeneticamente é um novo hospedeiro com o qual este inseto tem relações ecológicas recentes.

Figura 12: Análise de *mismatch distribution* para sequências de COI de *Tibraca limbativentris* coletadas no estado do Maranhão.



## 5. CONCLUSÕES

- Os dados de polimorfismo do gene COI para *T. limbativentris* coletados em áreas orizícolas em diferentes biomas do estado do Maranhão, apontam para uma homogeneidade genética entre os grupos e uma expansão populacional recente deste inseto-praga com a cultura do arroz;
- Presume-se que o fluxo gênico esteja ocorrendo nas populações de *T. limbativentris* pelos baixos valores de divergência genética, arranjo filogenético e quantidade de haplótipos compartilhados;
- A ausência de sequências de COI para espécies do gênero *Tibraca* dos biomas maranhenses e da região Neotropical registradas na plataforma do NCBI não permite determinar relações filogenéticas mais informativas para este táxon.

## REFERÊNCIAS

AGEITEC – Agencia EMBRAPA de Informação tecnológica. Disponível em < <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuye4xq602wyiv80166s qf4qsy51i.html> >. Acesso em 11 set 2017.

AMORIM, D. S.; MONTAGNINI, D. L.; CORREA, R.J; NOLL, M.S.M.C.; NOLL, F.B. Diversidade biológica e evolução: uma nova concepção para o ensino de Zoologia e Botânica no segundo grau, p. 38 – 45. In: BARBIERI, M. R. (Org), **A construção do conhecimento do professor**. Uma experiência de integração de professores do ensino fundamental e médio da Rede Pública à universidade. Ribeirão Preto: HOLOS /FAPESP, 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 4. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017. 864 p. ISBN 9788582714058.

ARAÚJO, R. R. **Filogenia Molecular da Família Pipridae (Aves, Passeriformes) através de Marcador Mitocondrial ND2**. 2011. 76f. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, 2011.

ARAÚJO, E. P. de; LOPES, J. R.; CARVALHO, FILHO, R. Aspectos socioeconômicos e de evolução do desmatamento na Amazônia maranhense. In: MARTINS, M. B.; OLIVEIRA, T. G. de. (org). **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. 1. ed. Belém: MPEG, 2011. 328 p.: il. Bibliografia: p. 34 -45. ISBN: 978-85-61377-52-6.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2. ed. Sinauer Massachusetts: Associates. Inc, Publischer. 2004. 684p.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman e Hall, New York. 1994.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 2000. 447p.

BABBIT, G. A.; KILTIE, R.; BOLKER, B. Are the fluctuant asymmetry studies adequately sampled implications of a new model size distribution. **The American Naturalist**, Chicago, v.167, n. 2, p. 230- 245, 2006.

BAGGIO, M.V.; **Análise dos genes mitocondriais COI e 16S de populações de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) de diferentes localidades geográficas.** 2010. 46f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal – São Paulo, 2010.

BANDELT, H.J; FORSTER, P; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, n. 16, p. 37-48. ISSN: 0737-4038, 1999.

BANHO, C. Á. **Caracterização filogenética de percevejos terrestres das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) por meio de marcadores moleculares.** 2016. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2016.

BARGUES, M. D., MARCILLA, A., RAMSEY, J., et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.567–573, 2000.

BARRIGOSI, J. A. F.; MARTINS, J. F. S. **Pragas e Método de Controle.** In: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. v.7, 2006.

BARRIGOSI, J.A.F.; FERREIRA, E.; LANNA, A.C. Panícula branca em arroz: o que causa? Goiânia: EMBRAPA – CNPAF, 2004. 4p. **Comunicado técnico 83.** ISSN 1678-961X.

BEARD, D. J; KYBERD, P. J.; FERGUSON, C. M.; DODD, C. A. Proprioception after rupture of the anterior cruciate ligament. An objective indication of the need for surgery? **The Bone & Joint Journal**, v.75, n.2, p. 311-5, 1993.

BEGON, M.; WALL, R. Individual variation and competitor coexistence: a model. **Functional Ecology**, v.1, n.3, p. 237-241. 1987.

BERTAZZI, T. **Agora ficou fácil aprender filogenia.** 2016. Disponível em: <<https://universoracionalista.org/agora-ficou-facil-aprenda-a-ler-uma-arvore-filogenetica/>>. Acesso em 22.09.2017.

BINNS, M. R.; NYROP, J. P.; VAN DER WERF, W. **Sampling and monitoring in crop protection: the theoretical basis for developing practical decision guides.** Hong Kong: Guildford & King's Lynn: Biddles., 2000. 284 p.

BIO212. **Genética de Populações.** Disponível em <<http://dreyfus.ib.usp.br/bio212/>> Acesso em 09.09.2017.

BOHNER, T. O. L.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, 2013.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data.** Geometry and Biology. New York: Cambridge University Press, 1991. 435 p.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.27, n. 8, p.1767-80, 1999.

BOTTA, R. A.; PAZINI, J. B.; SILVA, F. F. Pico populacional de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) na sua fase crítica de ocorrência em cultivar precoce de arroz irrigado na região da fronteira oeste, RS. In: CONGRESSOS BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 7., 2011. Balneário Camboriú, SC. **Resumos...** Santa Catarina: SOSBAI, 2011. p. 635-637.

BOTTON, M.; MARTINS, J. F. S.; LOECK, A. E.; ROSENTHAL, M. D'A. Biologia de *Tibraca limbativentris* sobre plantas de arroz. 1996. Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Sociedade Entomológica do Brasil, 1996. v. 25, n.1, p. 217-221.

BRAGANÇA, M.; SOUZA, O. D.; ZANUNCIO, J. C. Environmental heterogeneity as a strategy for pest management in Eucalypto plantations. **Forest Ecology and Manager**, v.102, p. 8-12, 1998.

BROWER, M. **Caracterização do meio morfo-pedológico nas regiões de Arari, Bacabal e Santa Quitéria.** São Luís: EMAPAIRAT- Empresa Maranhense de Pesquisa Agropecuária, 1977. 39 p.

CALLAWAY, R. M., PENNINGGS, S. C.; RICHARDS, C. L. Phenotypic plasticity and interactions among plants. **Ecology**, v.84, n.5, p.1115-1128, 2003.

CASTILHO, R. **Genética de Populações: Noções Básicas com aplicação em aquicultura**. Disponível em: <w3.ualg.pt/~rcastil/Livro%20GP%20Canárias%20Rita%20Castilho.DOC>. Acesso: 09/2017.

CASTRO, R. S. de. **Variação genética quantitativa e estrutura populacional de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart. ex Hayne) no Cerrado**. 2016. 87f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás Escola de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas. Goiânia, GO, 2016.

CAVELIER, L.; JAZIN, E.; JALONEN, P.; GYLLENSTEN, U. MtDNA substitution rate and segregation of heteroplasmy in coding and noncoding regions. **Human Genetics**, v.107, p. 45-50, 2000.

CIANCIARUSO, M.V., SILVA, I.A. & BATALHA, M.A. Phylogenetic and functional diversities: new approaches to community Ecology. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 93 – 103, 2009.

CHINNERY, P. F.; HUDSON, G. Mitochondrial genetics. **British Medical Bulletin**, v.106, p. 135-59, 2013.

COELHO, A. A; MATTOS JUNIOR, J. S. Educação do campo e desenvolvimento territorial: perspectivas e desafios no município de Nina Rodrigues – MA. In: ENCONTRO NACIONAL DE GEOGRAFIA AGRÁRIA, 21., 2012. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2012.

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

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março de 2017**. Brasília: CONAB, v. 4, n. 6, 2017. 176 p.

COSTA, E. A. **Distribuição espacial e preferência alimentar de *Tibraca limbativentris* Stal (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) na cultura do arroz e em vegetação nativa e espontânea na região norte maranhense**. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão. São Luís - Maranhão, 2014.

COSTA, E. C.; LINK, D. Avaliação de danos de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. 21., 1992. Porto Alegre. **Anais...** Sociedade Entomológica do Brasil, 1992. p. 187-195.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. 2006. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, vol.20, n.1, p. 13-23, 2006. Print version ISSN 0102-3306, On-line version ISSN 1677-941X.

CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (Embrapa Milho e Sorgo. **Documentos**, 21). 2002. 15p.

CRYAN; J. R; URBAN, J. M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? **Systematic Entomology**, v. 37, p. 7-21, 2012.

DARLU, P.; TASSY. P. La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Avertissement à la version électronique. Paris, ISBN: 2-225-84229-9 ISSN: 0754-4405. 2004.

DINIZ, M. B.; OLIVEIRA JUNIOR, J. N. de; TROMPIERI NETO, N.; DINIZ, M. J. T. Causas do desmatamento da Amazônia: uma aplicação do teste de causalidade de Granger acerca das principais fontes de desmatamento nos municípios da Amazônia Legal brasileira. **Nova economia**, Belo Horizonte, vol.19, n.1, p. 121 - 151, 2009.

EWERS, R.M.; DIDHAM, R.K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 117-142, 2006.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.34, p. 487-515, 2003.

FAO, Food and Agriculture Foundation. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-marketmonitor-rmm/en/>>. Acesso em: 01 de jan. 2017.

FAO, Food and Agriculture organization of the United Nations. **FAOSTAT Countries by commodity**. Rice, 2014. Quantity, disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>.

FARIAS FILHO, M. S. **Caracterização e avaliação do cultivo do arroz em sistema de vazante na Baixada maranhense**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão. São Luís - Maranhão, 2006.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. de L. **Arroz de sequeiro em aléias de leguminosas em solos de baixa fertilidade natural**. 2000. 126f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ: UFFRJ, 2000.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. de L. O cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do trópico úmido. In: MOURA, E. G. (Org.). **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. 1. ed., São Luís: UEMA, 2004. v.1, p. 61-88.

FERREIRA, E.; ZIMMERMANN, F. J. P.; SANTOS, A. B. dos; NEVES, B. P. das. **O Percevejo-do-Colmo na Cultura do Arroz**. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 1997. 43p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 75).

FERREIRA, L. V.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. **Estudos avançados**, São Paulo, v.19, n.53, 2005.

FERNANDES, R. T.; LEMOS, J. de J. S.; CARDOSO, E. S. Agricultura, degradação ambiental e socioeconômica em Zé Doca – município da Amazônia Maranhense. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 64., 2012, **Anais/ Resumos eletrônicos ...** São Luís: UFMA, 2012. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/64ra/resumos/resumos/6771.htm>>. Acesso em: 15 nov.2017.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

FORNASIERI, J. L.; FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do arroz**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 589 p.

FULLER, R. C.; HOULE, D. Detecting genetic variation in developmental instability by artificial selection on fluctuating asymmetry. **Journal of Evolutionary Biology**, v.15, p. 954-960, 2002.

FUJIHARA, R. T., FORTI, L. C., ALMEIDA, M. C., BALDIN, L. L. **Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias**. Botucatu: FEPAF, 2011. 391p.

FUTUYMA, D. J. **Evolução, ciência e sociedade**. New York-Stony Brook: Office of University Publications. Rutgers. The State University of New Jersey, 2002. 73p.

GENNIS, R. B. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. **Biochim Biophys Acta**, v.1101, n. 2, p. 184–187,1992.

GERLING, D. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 63, p. 13-21, 2002.

GOMES, M. O. **Relações filogenéticas das famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera: Pentatomomorpha) baseadas nas sequências de genes mitocondriais (Cyt b, COI e 16S), nucleares (28S e 18S) e informações morfológicas**. 2013. 105 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013.

GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Friesemelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciência – Biologia/Genética) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2010.

GOULA, M.; MATA, L. Clase Insecta- Orden Hemiptera- Suborden Heteroptera. **Revista IDE@ - SEA**, n. 53. p. 1–30. ISSN 2386-7183 1, 2015. Disponível em [www.sea-entomologia.org/IDE@](http://www.sea-entomologia.org/IDE@).

GRAZIA, J.; FORTES, N.D.F.; CAMPOS, L.A. Pentatomoidea. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, 5: invertebrados terrestres. São Paulo: FAPESP, 1999. p.101-112.

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

GUIMARÃES, M. A. **Cladogramas e Evolução no Ensino de Biologia**. 2005. 233f. Dissertação (Mestrado em Educação para a Ciência) - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2005.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium – Journal**, v.41, p.95-98, 1999.

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

HEBSGAARD, M. B., ANDERSEN, N. M., DAMGAARD, J. Phylogeny of the true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera–Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology, **Systematic Entomology**, v. 29, p.488-508, 2004.

HEMINGWAY, J., RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu*, **Review Entomology**, v. 45, p.371-391, 2000.

HENNIG, W. Phylogenetic Systematics. Urbana: University of Illinois Press, 1966.

HOROWITZ, A. R. DENHOLM. I.; GORMAN, K.; CENIS, J. L.; KONTSEDALOV. S.; ISHAAYA, I. Biotype Q of *Bemisia tabaci* Identifi ed in Israel. **Phytoparasitica**, v. 31, p. 94-98, 2003.

HUA, J.; LI, M.; DONG, P.; CUI, Y.; XIE, Q.; BUEMAIL, W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9 n.134, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Atlas do estado do Maranhão**. Rio de Janeiro-RJ: Gráfica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1984. 104p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.30 n.7 p.1-83, 2017. Bibliografia: 20021-120 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil. ISSN 0103-443X.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 2004. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas\\_e\\_Mapas/Mapas\\_Murais/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/)>. Acesso em: 27/11/2017.

JARDIM, R. O.; RIBEIRO, A. P.; FARIAS FILHO, M. S. Modernização do campo e as transformações sociais atuais na microrregião de Itapecuru-Mirim, MA. In: ENCONTRO NACIONAL DOS GEOGRÁFOS, CRISES, PRÁXIS E AUTONOMIA: espaços de resistências e de esperanças, espaço de diálogos e práticas, 16, 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: 2010.

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

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

KARDONG, K. V. **Vertebrates. Comparative Anatomy, Function, Evolution**. xvii + 777 pp. Dubuque, Melbourne, Oxford: Wm. C. Brown Publishers (Times Mirror International Publishers). ISBN 0697 219917, 1995.

KHUSH, G. S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2005.

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

KOSTAL, V. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity? **Journal of Insect Physiology**, Philadelphia, v. 57, n. 5, p. 538-556, 2011.

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

LI, X., SCHULER, M. A., BERENBAUM, M. R., Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. **PLOS ONE**, v. 7, 2012.

LIMA, L. H. C; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C.; NÁVIA, D.; OLIVEIRA, M. R. V. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 217-223, 2002.

LOPES, S. G. B. C.; HO, F. F. C. **Noções básicas de sistemática filogenética**. Licenciatura em Ciências · USP/Unifesp. Disponível em <[https://midia.atp.usp.br/impressos/lic/modulo03/diversidade\\_biolologica\\_filogenia\\_PLC0019/Bio\\_Filogenia\\_top04.pdf](https://midia.atp.usp.br/impressos/lic/modulo03/diversidade_biolologica_filogenia_PLC0019/Bio_Filogenia_top04.pdf)>. Acesso em 14.09.2017.

LOPES, W. R.; VASCONCELOS, S. D. Representação e distorções conceituais do conteúdo “filogenia” em livros didáticos de biologia do ensino médio. **Revista Ensaio**. Belo Horizonte, v.14, n. 3, p. 149-165, 2012.

LU, L. **Implementation of a two-way interactive atmospheric and ecological model and its application to the central United States**. 1999. 134pp. Dissertation. Department of Atmospheric Science, Colorado State University, Fort Collins, CO, 1999.

MACIEL, A. A. S.; LEMOS, R. N. S. de; SOUZA, J. R. de; COSTA, V. A.; BARRIGOSI, J. A. F.; CHAGAS, E. F. das. Parasitismo de ovos de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) na cultura do arroz no Maranhão. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 616-618, 2007.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; TERRES, A. L.; FAGUNDES, P. R.; FRANCO, D. F.; ANDRES, A. Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 143- 160.

MAGALHÃES, Silvia Daniela L. **Sequenciação completa do mtDNA por MPS e avaliação da detecção de heteroplasmias**. 2015. 104 f. Dissertação (Mestrado em Genética Forense) – Departamento de Biologia, Universidade do Porto (IPATIMUP), 2015.

MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**. 1. ed. Oxford, Reino Unido: BLACKWELL SCIENCE LTD, 2004. 256 p.

MARCUS, L. F.; CORTI, M.; LOY, A.; NAYLOR, G. J. P.; SLICE, D. E. **Advances in Morphometrics**. New York: NATO ASI series A: Life Sciences, Plenum Press, vol. 284, 1996.

MARTINS, J. F. da S.; CUNHA, U. S.; OLIVEIRA, J.V. et al. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D. (Ed). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: PALLOTTI, 2000, p.137-153.

MARTINS, J. F. D. S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; QUINTELA, E. D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n. 6, p. 1681-1688, 2004.

MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; LIMA, L. H. C.; MONNERAT, R. G. Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. ISSN 1676 – 1340. 2005.

MARTINS, J. F. da S.; BARRIGOSI, J. A. F.; OLIVEIRA, J. V. de; CUNHA, U. S. da. Situação do manejo integrado de insetos-praga na cultura do arroz no Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. **Documentos**, 290. ISSN 1806-9193. RS, 2009.

MARTINS, J. F. S.; PAZINI, J. B.; BOTTA, R. A.; RUBENICH, R.; SILVA, F. F.; MATTOS, M. L. T. Efeito de Fungos Entomopatogênicos na Redução Populacional do Percevejo-do-colmo do Arroz. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014.4p (**Circular Técnico**, 150).

MARTINS, J. F. da S.; OLIVEIRA, J. V. de; BARRIGOSI, J. A. F.; CUNHA, U. S. da. **Manejo de insetos-praga**. AGEITEC. 2017. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuye4xq502wyiv80166sqf3jeq1xg.html>>. Acesso em: 22 fev.2018.

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

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. ed. Holos, 2004. 202 p. Bibliografia: ISBN 8586699276

MEUS, N. C.; PAZINI, J. B.; BOTTA, R. A.; DIAS, N.P.; SILVA, F.F. da. Hora de aplicar. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 151, p. 36-38, issn: 1516358X, 2012.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MEYER, D. Árvores Evolutivas Humanas: Uma Discussão sobre a Inferência Filogenética. In: **Série Monografias 3**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 1-162. 1995.

MIOTTO, K. Amazônia maranhense requer atenção para continuar existindo. **O Eco**. 2012. <Disponível em: <http://www.oeco.org.br/reportagens/25649-amazonia-maranhense-requer-atencao-para-continuar-existindo/>>. Acesso em: 15nov 2017.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. 1. ed. Ribeirão Preto: HOLOS. 1999. 198p.

MOREIRA, M. F, MANSUR, J. F.; MANSUR, J. F. **Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCTEM, 2012. Disponível em< file:///C:/Users/Luciana/Downloads/Capitulo%2015%20Resistencia%20a%20Inseticidas%20-%20Estrategias%20Desafios%20e%20Perspectivas%20no%20Controle%20de%20Insetos.pd f>

MOURA, E. G. de M. Agroambientes de transição avaliados numa perspectiva da agricultura familiar. In: MOURA, E. G. de M. (org). **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e semi-árido maranhense**. São Luís: Série Agroecologia – UEMA, 2006. v.1, 2ª Edição, p.9- 43.

MURAJI, M.; TACHIKAWA, S. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. **Entomological Science**, v.3, p. 615-626, 2000.

NEFF, N. A.; MARCUS, L. F. **A survey of multivariate methods for systematic**. New Yoirk, Privately puplished, 1980. 234p.

OLIVEIRA, M. C. de S.; REGITANO L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **(Recurso Eletrônico)**, São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste, SP, 2007.

PACHECO, V.; PATTERSON, B. D. Phylogenetic Relationships of the New World Bat Genus *Sfurnira* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Bolletin of the American Museum of Natural History**, v. 206, p. 101-121, 1991.

PANTOJA, A.; TRIANA, M.; BASTIDAS, H.; GARCÍA, C.; DUQUE, M. C. Development of *Tibraca obscurata* and *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) in rice in southwestern Colombia. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, vol. 89, n. 3-4, 2005.

PANTOJA, A.; TRIANA, M.; BASTIDAS, H.; GARCIA, C.; MEJIA, O. I.; DUQUE, M. C. Damage by *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) to rice in Southwestern Colombia. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, San Juan, v. 91, n. 1-2, p. 11-18, 2007.

PEDERNEIRAS, C. L. **Conceitos Básicos de Filogenia**. Instituto de Botânica/ Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. 2011. Disponível em: [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Conceitos\\_Basicos\\_%20de\\_%20Filogenia\\_Leandro\\_Cardoso\\_Pederneiras.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Conceitos_Basicos_%20de_%20Filogenia_Leandro_Cardoso_Pederneiras.pdf)

PEREIRA, J. A. **A cultura do Arroz no Brasil: subsídios para sua história**. Teresina: EMBRAPA-MEIONORTE, 2002, 226 p.

PECHENIK, J. A. **Biologia de Invertebrados**. 7. ed., Brasil: MC GRAW HILL, 2016, 628 p. Bibliografia: ISBN - 8580555817, 9788580555813.

PRANDO, H. F.; KALVELAGE, H.; FERREIRA, R. A. Ciclo de vida de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 335-339, 1993.

PRIMACK, R. B.; KANG, H. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.20, p. 367-396, 1989.

RADFORD, A. E.; CADDELL, G. M. **Fundamentals of Plant Systematics**. New York: HARPER & ROW, 1986. 498 p.

RAMPELOTTI, F. T. et al. Constatação da diferença da razão sexual de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) amostrados em regiões orizícolas de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: ORIUM, 2005. v. 2. p. 134-136.

RAMPELOTTI, F. T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H. F.; GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; TCACENO, F. A.; MATTOS, M. L. T. Patogenicidade de

*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, usando marcadores RAPD. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 141-148, 2007.

RAMPELOTTI, F. T.; FERREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; MARTINS, J. F. da S.; GRÜTZMACHER, A. D.; PRANDO, H. F. Diversidade Genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, Usando Marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, v.37, n. 1, p. 20-29, 2008.

REIS, S. F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, n.5, p.571-580, 1988.

RIFFEL, C. T. **Levantamento e aspectos biológicos de espécies parasitóides de posturas do percevejo-do-colmo-do-arroz no Estado de Santa Catarina**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2007.

RIVERA, L. M. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P. R. M. Variabilidade genética de espécies de Culicidae e Simuliidae usando marcador mitocondrial. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 23-31, 2012.

ROSA, A. J. de M.; PAIVA, S. R. Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. EMBRAPA. 2009. Disponível em [http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2009/doc/doc\\_254.pdf](http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2009/doc/doc_254.pdf). Acesso em 09.2017.

SAGRIMA. **Notícias**. 2013. Disponível em: < <http://senar-ma.org.br/maranhao-se-mantem-como-terceiro-maior-produtor-de-arroz-do-brasil/>>. Acesso em: 30.06.2015.

SAGRIMA. Perfil da Agricultura Maranhense. Maranhão - Dezembro /2016. Disponível em: <http://www.sagrma.ma.gov.br/files/2017/01/boletim-final-18-01.pdf>. Acesso em 05nov. 2017.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, p 1350-1354, 1985.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Science U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7. dez. 1977.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, R.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3.ed. N.Y.: Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, 2001.

SANTOS, A. B. dos; SANTIAGO, C. M. Comissão Internacional do Arroz: resultados da 20ª sessão / tradução de Roselene de Queiroz Chaves. - Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 56 p. - (**Documentos** / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678- 9644, 172).

SANTOS, C. M. D. Os dinossauros de Hennig: sobre a importância do monofiletismo para a sistemática biológica. **Scientiae Studia**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 179-200, 2008.

SANTOS, C. M. D.; CALOR, A. R. Using the logical basis of phylogenetics as the framework for teaching biology. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 48, 18, p. 199-211, 2008.

SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochem Science**, v.15, n.11, p. 430-4, 1990.

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

SCHNEIDER, H. **Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. Ribeirão Preto: HOLOS- Sociedade Brasileira de Genética Press, 2003. 114p.

SCHUH, T. T.; SLATER, J. A. **True bugs of the world (Hemiptera:Heteroptera) Classification and natural history**. New York: Cornell UNIVERSITY, 1995. 338p.

SCHWARTZ, S.; ZHANG, Z.; FRAZER, K. A. et al. PipMaker – A web server for Aligning two genomic DNA sequences. **Genome Research**, v. 10, n. 4, p. 577-586, 2000.

SILVA, C. C. A.; CORDEIRO, D. M.; LAUMANN, R.; MORAES, M. C. B.; BARRIGOSI, J. A. F.; BORGES, M. Ciclo de vida e metodologia de criação *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**).

SILVA, A. C. da; MOURA, E. G. de. Atributos e especificidades de solos de baixada no

Trópico Úmido. In MOURA, E. G. (Org.). **Agroambientes de Transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA, 2004. v. 1, 1ª Edição, p. 133 -155.

SILVA, M. C. da S.; LEMOS, R. N. S.; LIMA, L.H. C.; FILHO, L. R. G.; PEREIRA, S. R. F. Variabilidade Genética de *Bemissia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em Cultivos Olerícolas em São Luís, MA. **Neotropical Entomology**, v. 38, n.6, p.762-768, 2009.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia: Ambiente Diversade** v. 3, n. 83, p. 157-163, 2012. ISSN 0102-2067.

SILVA, L. S.; LIMA, C. F. Arroz. In: LIMA, M. C.; OLIVEIRA, E; SIQUEIRA, L. **Grãos, raiz e pluma**. São Luís: EDUFMA, 2012. p. 23- 39.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

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

SOARES, L. C. **Biologia e Biodiversidade**. 22. ed. Maringá: CESUMAR, 2012. 216 p. Bibliografia: CDD - 578.7 CIP - NBR 12899 - AACR/2.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado** (29: 2012: Gravatal, SC). Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil/Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Itajaí, SC: SOSBAI, 2012. 179p.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado**. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / XXX Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, Santa Maria, RS, 2014, 192p.

SOUTO, K. C. F. L. **Influência ambiental na morfometria de insetos**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SOUZA, H. V. de. **Relacionamento filogenético de espécies pertencentes às famílias Coreidae e Pentatomidae (Heteroptera) a partir dos genes mitocondriais COI, 16S e nuclear 18S**. 2013. 128 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 2013.

SOUZA-FIRMINO, T. S. **Estudo Intra e Interpopulacional de Pachycoris torridus (Scopoli, 1772) (Heteroptera: Scutelleridae)**. 2015, 100 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

SOUZA, P. H. R. de; ROCHA, M. B. Sistemática Filogenética em Revista de Divulgação Científica: Análise da Scientific American Brasil. **Alexandria: Revista de Educação em Ciência e Tecnologia**, v.8, n.1, p.75-99, maio 2015.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, p. 199–203, 2000.

TAUBER, H. Analysis of stable isotopes in prehistoric populations. In: B. HERMANN (ed.): **Innovative Trends in Prehistoric Anthropology. Mitteilungen del Berliner Gesellschaft für Anthropologie, Ethnologie und Urgeschichte**. v.7, p. 31-38, 1986.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TAMURA. K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.512-526, 1993.

TEIXEIRA, L. V.; NITTO, F. M. C. Início da atividade de vôo em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae): influência do tamanho da abelha e da temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Zoociência**, Juiz de Fora, v.7, n. 2, p. 195-202, 2005.

THOMAZINI, M.J.; THOMAZINI, A.P.B.W. A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 21p. (Embrapa Acre. **Documentos**, 57).

TIAN, Y.; ZHU, W.; LI, M. et al. Influence of data conflict and molecular phylogeny of major clades in Cimicomorphan true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 581-597, 2008.

TRUJILLO, Manuel. R. **Contribuição ao conhecimento do dano e biologia de *Tibraca limbativentris* (Stal, 1960) (Hemiptera: Pentatomidae) praga da cultura de arroz**. 1970. 78 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Piracicaba- SP, 1970.

UNIFOA – Centro Universitário de Volta Redonda. 2012. Disponível em: <[http://web.unifoa.edu.br/portal/plano\\_aula/arquivos/04762/grupos\\_mono\\_e\\_nao\\_monofileticos%20\[Modo%20de%20Compatibilidade\].pdf](http://web.unifoa.edu.br/portal/plano_aula/arquivos/04762/grupos_mono_e_nao_monofileticos%20[Modo%20de%20Compatibilidade].pdf)>.

VENDRAMI, Daniel, P. **Estudos populacionais de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) baseado em marcadores mitocondriais e morfometria geométrica**. 2017. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

WALTER, H. **Vegetação e Zonas Climáticas**: Tratado de ecologia global. São Paulo: E.P.U. Ltda. 1986. 326 p.

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

WATANABE, Y. Genomic constitution of Genus *Oryza*. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 487-510, 2011.

WEIRAUCH, C.; MUNRO, J. B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.53, p.287-99, 2009.

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

XIA, X. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. **Journal of Heredity**, v.108, p. 431-437, 2017.

YAGI, T.; SASAKI, G.; TAKEBE, H. Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 1, p. 42-48, 1999.

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

ZATS, M. Produto de PCR: qualidade e quantificação. Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2015. Disponível em: <http://genoma.ib.usp.br/pt-br/servicos/sequenciamento/produto-de-pcr-qualidade-e-quantificacao>. Acesso em: 02/10/2017.

ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D. FINK, W. L. **Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer**. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, 2004.

ZOLET, T. A. C., PINHEIRO, F., SALGUEIRO, F.; PALMA, S. C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v.22, p.1193-1213, 2013.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e ISSR**. 2002, 148f. Tese (Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ, Piracicaba, 2002.