



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**DNA BARCODING E ESTRUTURAÇÃO
POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE *Belostoma*
(Belostomatidae: Hemiptera) E *Culicoides*
(Ceratopogonidae: Diptera) DA PLANÍCIE
COSTEIRA DO RIO GRANDE DO SUL**

Thaísa Bozzetti Gautério

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lizandra Jaqueline Robe
Coorientador: Prof. Dr. Augusto Ferrari

Rio Grande
2021



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**DNA Barcoding e estruturação populacional de espécies de
Belostoma (Belostomatidae: Hemiptera) e *Culicoides*
(Ceratopogonidae: Diptera) da Planície Costeira do Rio Grande do
Sul**

Aluno: Thaísa Bozzetti Gautério

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lizandra Jaqueline Robe

Coorientador: Prof. Dr. Augusto Ferrari

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC) como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2021

Ficha Catalográfica

G275d Gautério, Thaísa Bozzetti.

DNA Barcoding e estruturação populacional de espécies de Belostoma (Belostomatidae: Hemiptera) e Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul / Thaísa Bozzetti Gautério. – 2021.

200 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Lizandra Jaqueline Robe.

Coorientador: Dr. Augusto Ferrari.

1. Belostoma 2. Culicoides 3. Identificação Molecular
4. Biogeografia 5. Modelagem de Nicho Ecológico 6. Filogenia
I. Robe, Lizandra Jaqueline II. Ferrari, Augusto III. Título.

CDU 574.9(816.5)

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



**ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 005/2021**

Às 09h00 (nove horas) do dia 13 (treze) do mês de dezembro de 2021 (dois mil e vinte e um), via Webconferência no endereço eletrônico: (<https://meet.google.com/koc-nzhk-ojf>) reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública da Tese de Doutorado da acadêmica Thaísa Bozzetti Gautério. A Tese intitulada “**DNA BARCODING E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE *Belostoma* (Belostomatidae: Hemiptera) E *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera) DA PLANÍCIE COSTEIRA DO RIO GRANDE DO SUL**” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Profª Dra Lizandra Jaqueline Robe (Orientadora e Presidente da banca), pelo Prof. Dr. Augusto Ferrari (Co-orientador), Profª Dra Adriana Gava (FURG); Profº Dr. José Ricardo Inácio Ribeiro (UNIPAMPA) e Profª Dra. Andressa Paladini (UFSM). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, a acadêmica concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **DOUTOR EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 12h30h (onze horas e trinta minutos) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.

Profª Dra Lizandra Jaqueline Robe

Prof. Dr. Augusto Ferrari

Profª Dra Adriana Gava

Profº Dr. José Ricardo Inácio Ribeiro

Profª Dra. Andressa Paladini

Thaísa Bozzetti Gautério

Prof. Dr. Rogério Tubino

Vianna

Coordenador do Curso

Dedico esta tese à minha querida Vó
Selma por ser meu exemplo de vida e
coragem, por ser minha inspiração e
por sempre me apoiar e torcer pela
realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Lizandra Robe, que me acolheu no laboratório durante o mestrado e que, no doutorado, topou o desafio de trabalhar com dois grupos de espécies completamente diferentes para nós duas. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, por me apoiar nos momentos difíceis e por ser sempre tão paciente e compreensiva.

Ao Prof. Dr. José Ricardo Inacio Ribeiro, pela ajuda na identificação de todos os espécimes de *Belostoma* deste trabalho, pela paciência em me ensinar com tantos detalhes a identificação das espécies, pelas discussões extremamente produtivas sobre o trabalho e que foram indispensáveis para a minha formação e também pelo acolhimento nas viagens à São Gabriel. Sou muito grata por toda a ajuda!

À TAE Daiane Carrasco pela companhia, ajuda e ensinamentos tanto durante as coletas quanto durante o trabalho no lab, pelas identificações de *Culicoides*, pelo conhecimento compartilhado, pelas tantas conversas, conselhos e trocas de conhecimento que tanto fizemos durante os últimos anos.

Ao Prof. Dr. Augusto Ferrari pela troca de conhecimentos durante o doutorado.

À Marina Milford pelos ensinamentos iniciais nas identificações morfológicas de *Belostoma*.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC – FURG) e aos docentes do PPG por todo o apoio desde o mestrado.

Agradeço aos professores membros da banca avaliadora pelas contribuições ao trabalho apresentado e por terem aceitado o meu convite, em especial à Prof^a. Dr^a. Adriana Gava que participou da minha vida acadêmica desde a graduação, que me inspirou a seguir o caminho da genética, que acompanhou o meu desenvolvimento na biologia desde a graduação e que vem sendo avaliadora dos meus trabalhos e compartilhando seu conhecimento comigo durante quase 10 anos. Meu sincero agradecimento, professora!

À Daiana e ao Murilo, por serem os presentes que a pós-graduação me deu, meus melhores amigos que levei para a vida, meus padrinhos de casamento. Vocês foram essenciais nos momentos mais difíceis e tornaram a pós-graduação uma das melhores fases da minha vida, com muitas risadas, conversas, choros, croassonhos e pães de queijo. Amo vocês!

Às colegas de laboratório Gisele, Tuca, Henrique, Maiara, Gabi, Aline e Cris, pela companhia no lab, risadas, conversas, conselhos e ajuda seja para uma análise, uma discussão de resultados ou para um café. À minha única colega de turma Maiby Glorize pelo apoio,

conselhos e conversas durante nosso período de doutorado. Vocês tornaram essa fase muito mais leve e divertida.

À minha psicóloga Jéssica por todo o apoio e orientação nos momentos difíceis e por tornar o final da jornada de doutorado mais leve e fácil.

Aos meus queridos amigos e padrinhos de casamento: Fernanda, Guilherme, Bruna e Eugênio por perdoarem minhas ausências nos últimos anos e por sempre manterem esse laço forte de amizade que nos une, especialmente às minhas melhores amigas desde o colégio, Nanda e Bru, vocês são as irmãs que eu escolhi, minhas dindas e ao mesmo tempo afilhadas de casamento, aquela amizade que sabemos que nunca vai mudar ou enfraquecer. Amo vocês muito!

À minha família, em especial aos meus pais por todo o apoio e incentivo durante todos estes anos de pós graduação, pela compreensão das minhas ausências e por todo amor. Obrigada por tudo, amo vocês eternamente!

À minha querida Vó Selma pelo amor, compreensão e por ser calmária nos momentos difíceis, por vibrar comigo por cada conquista e por compartilhar comigo tantas histórias da vida. Me orgulho e me espelho em você por ser corajosa, mas sem perder a doçura que lhe é tão marcante.

À Zazá e ao Roger pela parceria e por estarem sempre presentes apoiando a mim e ao Regis seja nos momentos bons ou naqueles nem tão bons assim.

Ao meu amado marido Regis Dutra, por ser meu porto seguro, meu melhor amigo e meu amor. Por toda a compreensão, apoio incondicional, conselhos, paciência, por me acolher nos piores momentos e por comemorar comigo os melhores. Obrigada por tudo que construímos juntos. Te amo muito!

À minha cachorrinha Leia que chegou na nossa casa em plena pandemia e despertou um amor tão grande que eu nem sabia que poderia sentir por um bichinho. Obrigada por ser a minha companheira inseparável durante as análises e a escrita da tese. Te amo, amada da mamãe!

Por fim, agradeço à FURG, por todo o suporte desde a minha graduação, pelo ensino gratuito e de qualidade e à agência financiadora - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – pela bolsa de estudo.

RESUMO

O Neotrópico é uma das regiões mais diversas do planeta, embora a maior parte de sua diversidade ainda não tenha sido descrita. Este cenário é especialmente preocupante devido à crise da biodiversidade atual, que pode ocasionar as chamadas “cripto-extinções”. Esta situação é ainda mais grave em grupos de espécies de tamanho corporal pequeno, como é o caso dos insetos. De fato, o impedimento taxonômico associado à grande diversidade de espécies, ao tamanho corporal reduzido e a ausência de caracteres diagnósticos mais efetivos é um problema que diversos grupos de insetos enfrentam. Alguns grupos de Diptera e Hemiptera, em especial aqueles pertencentes a gêneros associados aos ambientes aquáticos, como *Belostoma* e *Culicoides* estão entre os mais afetados pelo impedimento taxonômico, o que está diretamente relacionado a um déficit no conhecimento de diversos aspectos relacionados à sua evolução ou à sua ecologia. Isso ocorre a despeito da importância ecológica e econômica apresentada por suas espécies. Assim, o objetivo geral desta tese foi analisar a diversidade taxonômica e os padrões associados à evolução de espécies de Diptera e Hemiptera da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS). Para isso, foram realizadas análises moleculares, morfológicas, biogeográficas e de modelagem de nicho ecológico. No capítulo 1, apresento o artigo intitulado “Disentangling the taxonomy of *Belostoma* Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA Barcoding approaches”, publicado na revista *Austral Entomology*. Neste estudo, sequências obtidas para dois genes mitocondriais (COI e 16S) suportaram a divisão de *Belostoma* em 10 clados, representados por seis espécies reciprocamente monofiléticas, uma espécie potencialmente nova e outros três clados demonstrando inconsistências taxonômicas. Em um destes clados, nove morfotipos diferentes, entre os quais três espécies do grupo *oxyurum*, demonstraram-se geneticamente similares, revelando a presença de grandes níveis de plasticidade fenotípica, e demonstrando a utilidade de ferramentas de DNA Barcode para o estudo do gênero. O segundo capítulo apresenta o manuscrito intitulado “Population structure of *Belostoma angustum* Lauck (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome”, submetido na revista *Invertebrate Biology* e que abordou a estruturação populacional de *B. angustum*, nas diferentes regiões geomorfológicas do Rio Grande do Sul, comparando amostras obtidas para a região da PCRS com aquelas coletadas nas demais regiões do Bioma Pampa a partir de sequências dos genes mitocondriais COI e 16S e do gene nuclear ITS. Este artigo demonstrou que, apesar da alta capacidade de dispersão da espécie, há sinal de estruturação populacional com divergência entre populações da PCRS e aquelas de regiões interiores. Este resultado vem de encontro com o único

estudo publicado até o momento abordando os padrões de distribuição da diversidade genética em *B. angustum*, que sugeria que esta espécie formava uma população panmítica. Este artigo também demonstra que a espécie alvo sofreu uma expansão populacional durante o Pleistoceno, quando parece ter colonizado áreas mais interiores a partir de um refúgio localizado em áreas mais antigas da PCRS. E, por fim, no terceiro capítulo intitulado “DNA Barcoding de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies”, a ser submetido na revista *Acta Tropica*, sequências de COI, 16S e 28S demonstraram a presença de 12 linhagens entre os espécimes amostrados. Entre as 12 espécies coletadas, apenas *C. bambusicola* e *C. pusilloides* revelaram-se reciprocamente monofiléticas, e níveis crípticos de diversidade foram revelados para *C. alvarezi*, *C. fernandoi* e *C. venezuelensis*. Por outro lado, *C. insignis* e *C. guttatus* compartilham haplótipos entre si e com um espécime de *C. fernandoi*, sugerindo a presença de plasticidade fenotípica dentro do subgênero *hoffmani*. Assim, evidenciamos neste artigo a necessidade de redefinição dos caracteres diagnósticos que utilizam as manchas das asas para definir espécies em *Culicoides*, principalmente para espécies pertencentes ao grupo *hoffmani*, e demonstramos a presença de diversidade críptica dentro do gênero. Pode-se dizer, por fim, que esta Tese obteve resultados importantes acerca da diversidade de dois dos principais grupos de insetos que ocorrem na PCRS. Apresentamos resultados importantes no âmbito da conservação para insetos predadores de topo em ambientes aquáticos como Belostomatidae. Além disso, também apresentamos informações relevantes para a identificação rápida de espécies de *Culicoides*, o que pode auxiliar no manejo destes importantes vetores de arboviroses que acometem tanto humanos quanto animais, causando prejuízos não apenas médicos e veterinários como também prejuízos econômicos.

Palavras-chave: *Belostoma*; *Culicoides*, Identificação molecular; Biogeografia, Modelagem de Nicho Ecológico; Filogenia.

ABSTRACT

The Neotropics is one of the most diverse regions on the planet, but the most of its diversity has not yet been described. This scenario is especially grave due to the current biodiversity crisis, which can result in “crypto-extinctions”. This situation is even more serious in small body sizes species groups such as insects. In fact, the taxonomic impediment associated with the great species diversity, reduced body size and the absence of more effective diagnostic characters is a problem that many groups of insects face. Some groups of Diptera and Hemiptera, especially those belonging to genera associated with aquatic environments, such as *Belostoma* and *Culicoides*, are among the most affected by the taxonomic impediment, which is directly related to a deficit in knowledge of several aspects related to its evolution or its ecology. This occurs despite the ecological and economic importance presented by its species. Thus, the general objective of this thesis was to analyze the taxonomic diversity and patterns associated with the evolution of Diptera and Hemiptera species of Rio Grande do Sul Coastal plain. For this, molecular, morphological, biogeographic and environmental niche modeling analysis were performed. In chapter 1, I present the article entitled “Disentangling the taxonomy of *Belostoma* Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA Barcoding approaches”, published in the journal *Austral Entomology*. In this study, sequences were characterized for two mitochondrial genes (COI and 16S) were supported the division of *Belostoma* into 10 clades, represented by six reciprocally monophyletic species, one potentially new species and another three clades demonstrating taxonomic inconsistencies. In one of these clades, nine different morphotypes, including three species of the *oxyurum* group, were genetically similar, revealing the presence of large levels of phenotypic plasticity, and demonstrating the use of DNA Barcode for the genus. The second chapter presents the manuscript entitled “Population structure of *Belostoma angustum* Lauck (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome”, submitted in the journal *Invertebrate Biology* and which approached the population structure of a *Belostoma* species, *B. angustum*, in the different geomorphological regions of Rio Grande do Sul, comparing samples obtained from the Coastal Plain with those collected in the other regions of the Pampa Biome from sequences of the mitochondrial genes (COI and 16S) and the nuclear gene ITS. This work demonstrated that, despite the high dispersal capacity of the species, there is a sign of population structuring between PCRS region and other more interior regions. This result differs from the only study published until now about the distribution patterns of genetic diversity in *B. angustum*, which suggested that this species

formed a panmitic population. This article also demonstrates that *B. angustum* underwent a population expansion during the Pleistocene, and appears to have colonized more interior areas from a refuge located in older areas of the PCRS. And finally, in the third chapter entitled "DNA Barcoding de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies", to be submitted in the journal Acta Tropica, COI sequences, 16S and 28S demonstrated the presence of 12 strains among the specimens sampled. Among the 12 species collected, only *C. bambusicola* and *C. pusilloides* were found to be reciprocally monophyletic, and cryptic diversity levels were revealed for *C. alvarezi*, *C. fernandoi* and *C. venezuelensis*. On the other hand, *C. insignis* and *C. guttatus* share haplotypes among themselves and with an *C. fernandoi* specimen, suggesting the presence of phenotypic plasticity within the *hoffmani* subgenus. Thus, in this article, we highlight the need to redefine the diagnostic characters that use wing spots to define *Culicoides* species, especially for those belonging to the *hoffmani* group, and we demonstrate the presence of cryptic diversity within the genus. Finally, it can be said that this thesis obtained important results about the diversity of two of the main groups of insects that occur in PCRS. We present important results in the field of conservation for predatory insects in aquatic environments such as Belostomatidae. In addition, we also present information for a rapid identification of *Culicoides* species, which can help in the management of these important arboviruses vectors that affect both humans and animals, causing not only medical and veterinary damage but also economic loss.

Keywords: *Belostoma*; *Culicoides*; Molecular identification; Biogeography; Environmental Niche Modeling; Phylogeny.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é resultante do projeto de doutorado que desenvolvi junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O principal objetivo da minha tese foi analisar a diversidade taxonômica e os padrões associados à evolução de espécies de Diptera e Hemiptera da PCRS. Neste sentido, abordei os seguintes objetivos ao longo dos capítulos da tese: comparar as delimitações de espécies obtidas por abordagens morfológicas e moleculares, a fim de testar a eficiência do DNA Barcode na identificação e delimitação de espécies de *Belostoma*, especialmente em relação às espécies de tamanho corporal pequeno, como aquelas pertencentes ao grupo *Belostoma oxyurum*; analisar os padrões de estruturação populacional de *B. angustum* em diferentes regiões geomorfológicas do Bioma Pampa; avaliar a monofilia recíproca e as relações filogenéticas entre espécies de *Culicoides* presentes na PCRS por meio da associação de marcadores morfológicos relacionados às manchas das asas e marcadores moleculares.

Na Introdução Geral abordei detalhadamente cada tema do meu estudo, entre eles a origem da biodiversidade no Neotrópico, seus amplos níveis de diversidade críptica ou desconhecida, bem como a ferramenta que visa auxiliar na resolução deste problema (o DNA Barcoding). Também descrevi as principais características relacionadas à ecologia, morfologia e às relações filogenéticas de cada grupo estudado (*Belostoma* e *Culicoides*) e, por fim, fiz uma breve descrição do Bioma Pampa e suas unidades geomorfológicas, bem como sua hidrologia, principalmente em relação à PCRS.

Os resultados foram apresentados em formato de artigos científicos ao longo dos três capítulos. O primeiro capítulo trabalha a taxonomia do gênero *Belostoma* sob uma perspectiva integrativa, envolvendo abordagens morfológicas e moleculares. Este artigo foi publicado na revista Austral Entomology em Maio/2021. O segundo artigo, que compõe o capítulo 2 da tese, aborda a estruturação populacional de *Belostoma angustum* nas regiões geomorfológicas do Bioma Pampa. Este artigo foi submetido à revista Invertebrate Biology. No terceiro capítulo é apresentado o artigo em que busquei avaliar questões associadas à monofilia recíproca e às relações filogenéticas entre as espécies de *Culicoides* presentes na PCRS através de marcadores moleculares e morfológicos. Este artigo deve ser submetido na revista Acta Tropica.

Por fim, apresento as considerações finais e perspectivas futuras do presente estudo. Finalizo a Tese apresentando publicações adicionais produzidas durante o período do doutorado (Anexo 1). Cada um dos capítulos está escrito de acordo com as normas das respectivas revistas para as quais os artigos foram/serão submetidos e ao qual o artigo do capítulo 1 foi publicado,

sendo que todas as normas estão disponíveis nos links ao início de cada capítulo. A Introdução Geral e as Considerações Finais e Perspectivas estão apresentadas seguindo as normas da ABNT.

Este trabalho de doutorado foi desenvolvido com a colaboração de alguns pesquisadores e instituições. O Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande foi onde desenvolvi a maior parte das atividades da tese. Também conduzi análises no Laboratório de Entomologia, Sistemática e Biogeografia (LESB) da FURG e no Laboratório de Estudos da Biodiversidade do Pampa (LEBIP) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), com a colaboração do Prof. Dr. José Ricardo Inácio Ribeiro.

As amostragens foram feitas com autorização para atividades com finalidade científica emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (IBAMA/ICMBio), sob a licença de coleta número 46140 em nome de Augusto Ferrari e 28013 em nome de Lizandra Jaqueline Robe. Os envios de amostras para sequenciamento no exterior foram realizados sob Registro de Licença número A85CDD7 (para *Belostoma*) e A02F6A4 (para *Culicoides*) emitida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético/Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado CGEN/SISGEN.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS.....	19
INTRODUÇÃO GERAL	20
Diversidade e diversificação de espécies na região Neotropical	20
DNA Barcode	23
Estruturação Populacional	25
Insetos	28
Diptera	28
Nematocera (Ceratopogonidae).....	29
<i>Culicoides</i>	29
Ordem Hemiptera: Subordem Heteroptera.....	33
Nepomorpha	34
Belostomatidae	35
Bioma Pampa.....	38
Geomorfologia do Bioma Pampa	39
A província costeira do Rio Grande do Sul	41
A Planície costeira do Rio Grande do Sul	42
Justificativa e objetivos da tese	44
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 1	57
Disentangling the taxonomy of <i>Belostoma</i> Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA Barcoding approaches.....	57
INTRODUCTION	59
MATERIALS AND METHODS.....	61
RESULTS.....	65
DISCUSSION.....	72
ACKNOWLEDGEMENTS.....	79
REFERENCES	79
CAPÍTULO 2	107
Population structure of <i>Belostoma angustum</i> (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome	107
ABSTRACT	109
1. INTRODUCTION.....	110
2. MATERIAL AND METHODS.....	113
3. RESULTS.....	119
4. DISCUSSION.....	123
5. CONCLUSION	125
6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	126
7. REFERENCES	126
CAPÍTULO 3	158
DNA Barcoding de <i>Culicoides</i> (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies.....	158
DNA Barcoding de <i>Culicoides</i> (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies.....	159
Abstract.....	159
INTRODUÇÃO.....	160
MATERIAL E MÉTODOS.....	163
RESULTADOS	165

DISCUSSÃO	176
REFERÊNCIAS	181
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	189
REFERÊNCIAS	193
ANEXOS	195
Anexo 1 – Publicações extras produzidas pela discente no período do doutorado	195
Anexo 2 – Certidões de Cadastro de Acesso para as espécies utilizadas no presente trabalho emitidas pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – CGEN/SISGEN.	196

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Demonstração do Barcoding gap (A) quando as distâncias intraespecíficas são menores do que as interespecíficas há a formação de um “gap”. Quando as distâncias intraespecíficas se sobrepõem as distâncias interespecíficas não há a formação de um “gap” e a técnica de DNA Barcode pode não ser efetiva (B). Fonte da imagem: MEYER; PAULAY (2005)..... 22
- Figura 2.** Esquema do processo de especiação parapátrica (Fonte: MELLO et al., 2012).....25
- Figura 3.** Esquema do processo de especiação alopátrica (Fonte: MELLO et al., 2012).....25
- Figura 4.** *Culicoides bambusicola* ♂. Foto por: Thaísa Bozzetti.....29
- Figura 5.** *Culicoides venezuelensis*, asa da fêmea mostrando venação e células (Fonte: CASTELLÓN; VERAS, 2015).....29
- Figura 6.** Macho de Belostomatidae carregando os ovos no dorso (Foto: Tom D. Schultz).....34
- Figura 7.** Filogenia recuperada por Ribeiro et al. (2017) em uma abordagem integrativa associando caracteres morfológicos a uma análise molecular multi-locus.....35
- Figura 8.** Planície Costeira do Rio Grande do Sul, com detalhamento de sua formação histórica. Adaptado de VILLWOCK; TOMAZELLI (2007).....41

CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Map of South America highlighting the Brazilian states where the collections were made (São Paulo, Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul). Two sampling points outside South America, reported for sequences downloaded from GenBank or BOLD (located in Texas and Kansas, USA), have not been shown in the map. Each symbol refers to a single collection point.....60
- Figure 2.** Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of the concatenated dataset including 650 bp of COI and 302 bp of 16S. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the posterior probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.....65
- Figure S1.** Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 650 bp fragment of the COI gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.....90
- Figure S2.** Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 302 bp fragment of the 16S gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.....91

Figure S3. Ampulla-like part and spermatheca of females of subclade 3 (a), subclade 4 (b), subclade 5 (c) and subclade 6 (d) of the Yellow clade (Fig. 2).....	92
Figure S4. Genitalia of males positioned across the large polytomy of the Yellow clade (Fig. 2), and provisionally identified as <i>Belostoma</i> sp. 1 (a), <i>Belostoma</i> sp. 2 (b), <i>Belostoma</i> sp. 3 (c) <i>B. sanctulum</i> (aff.) (d).....	93
Figure S5. Male identified as <i>B. horvathi</i> (aff.) along the Yellow clade (Fig. 2), with detach to (a) prosternal carena and (b) genitalia.....	94

CAPÍTULO 2

Figure 1. Map showing the distribution of <i>Belostoma angustum</i> on South America. New registers obtained for the Coastal Region in this study are depicted in blue; registers previously reported by Stefanello et al. (2019) for the interior geomorphological units of the Pampa Biome are represented in yellow; other registers are represented in black. The area of Brazil, Uruguay, Argentina and Bolivia appear in yellow, green, pink and blue, respectively.....	137
Figure 2. Chronophylogenetic tree obtained with the multi-locus dataset (the mitochondrial COI and 16S genes, and the nuclear ITS marker). Values above and below (in bold) internal nodes refer to the mean divergence dating and posterior probability of each clade, respectively. Bars represent the 95% highest posterior density interval (HPD) for the divergence dating.....	138
Figure 3. Genealogical relationships recovered among haplotypes or alleles samples at Coastal and Interior Pampas for (a) 16S; (b) ITS; (c) COI. Mutational steps are represented by dashes, and the diameter of the circles is proportional to the number of individuals presenting each sequence.....	139
Figure 4. Graph of the variation in the effective population size (N_e) inferred for <i>B. angustum</i> over time. The dashed black line represents the average variation in N_e over time, whose 95% confidence intervals (CPD) are delimited in gray. Time is referred as Mya.....	140
Figure 5. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for <i>B. angustum</i> at Late Pliocene.....	141
Figure 6. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for <i>B. angustum</i> at the Marine Isotope Stage 19 (MIS, c. 787 ka).....	141
Figure 7. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for <i>B. angustum</i> at the Last Interglacial Period (LIG, c. 120-140 ka).....	142
Figure 8. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for <i>B. angustum</i> at (a) the Last Glacial Maximum (LGM, c. 21 ka).....	142
Figure 9. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for <i>B. angustum</i> at the present.....	143
Figure S1. Phylogenetic tree of Bayesian Analysis of COI gene. Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.	152

Figure S2. Phylogenetic tree of Bayesian Analysis of 16S gene. Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.....153

Figure S3. Phylogenetic tree of Bayesian Analysis of ITS gene. Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.....154

Figure S4. Phylogenetic tree obtained with the multi-locus dataset (the mitochondrial COI and 16S genes, and the nuclear ITS marker). Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.....155

CAPÍTULO 3

Figura 1. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para COI. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.....166

Figura 2. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para 28S. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.....167

Figura 3. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para 16S. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.....168

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Ranges of intra and inter-clade COI distances for each of the retrieved clades.....	86
Table 2. Ranges of intra and inter-clade 16S distances for each of the retrieved clades.....	87
Table S1. New <i>Belostoma</i> species collected in this study with their respective sexes, collection points, geographic coordinates and GenBank accession numbers.....	95
Table S2. Sequences of <i>Belostoma</i> and outgroup species downloaded from GenBank or BOLD.....	102

CAPÍTULO 2

Table 1. Summary statistics of genetic diversity and neutrality tests performed for all evaluated specimens of <i>B. angustum</i> , or for specimens collected at the Coast or Interior areas of the Pampa Biome, based on individual markers (16S, COI or ITS), the concatenated mitochondrial dataset (16S + COI) and the concatenated multi-loci dataset (16S + COI + ITS). Significant values are reported in bold.....	133
Table 2. Pairwise FST values estimated between specimens of <i>B. angustum</i> collected at Coastal and Interior areas of the Pampa Biome, based on individual markers (16S, COI or ITS), the concatenated mitochondrial dataset (16S + COI) and the concatenated multi-loci dataset (16S + COI + ITS). All values were significant.....	134
Table 3. Mean test AUC values for the 10 replicate runs and the standard deviation for each of the models used (except Random Forest).....	134
Table S1. <i>Belostoma angustum</i> collected in this study, with their respective collection points, geographic coordinates and GenBank accession numbers.....	144
Table S2. Values of AMOVA for 16SrRNA.....	151
Table S3. Values of AMOVA for COI.....	151
Table S4. Values of AMOVA for ITS.....	151
Table S5. Values of AMOVA for mitochondrial concatenated matrix.....	151
Table S6. Values of AMOVA for concatenated matrix of COI + 16S + ITS.....	151

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de COI.....	171
Tabela 2. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de 16S.....	172
Tabela 3. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de 28S.....	173
Tabela S1. Espécies e pontos de coleta de <i>Culicoides</i>	185

INTRODUÇÃO GERAL

Diversidade e diversificação de espécies na região Neotropical

O período Paleogeno (entre 66 e 23 milhões de anos atrás) compreende as épocas Paleoceno, Eoceno e Oligoceno; já o período Neogeno (entre 23 e 2,6 milhões de anos atrás) compreende Mioceno e Plioceno. Ambos períodos caracteriza-se, principalmente, pela ocorrência de eventos paleogeográficos relacionados à deriva continental, à orogenia andina, ao fechamento do Istmo do Panamá ou à inundação das bacias Orinoco e Amazonas, entre outros. Já o Quaternário (a partir de 1,8 milhões de anos atrás) congrega o Pleistoceno e o Holoceno, e se caracteriza pela ocorrência de eventos paleoclimáticos, com alternância de períodos glaciais e interglaciais e de regressões e transgressões marinhas. No Hemisfério Sul, em ambientes terrestres, este último período apresentou oscilações entre períodos secos e úmidos, com a expansão e retração alternada de biomas florestados e não-florestados, coalescência em forma de refúgios e nova expansão (HAFFER, 1997). Em ambientes aquáticos, por outro lado, as flutuações no nível do mar alteraram os níveis de estruturação populacional, tanto de espécies de água salgada (LIU et al., 2007), quanto de espécies de água doce (JOWERS et al., 2008).

A região Neotropical constitui uma das regiões biogeográficas com maior riqueza de espécies (LIMA et al., 2018), apresentando cinco países reconhecidos mundialmente como megadiversos (MITTERMEIER, 1988; MITTERMEIER et al., 1997). Segundo Rull (2008) existem três principais hipóteses que buscam explicar a origem e diversificação desta biota: (1) a primeira prevê maior impacto das alternâncias entre períodos glaciais e interglaciais que ocorreram no Pleistoceno, (2) a segunda afirma que a maior parte das espécies atuais surgiram no Paleogeno e Neogeno, antes das glaciações do Quaternário e (3) a terceira sugere uma diversificação contínua ao longo dos períodos Paleogeno, Neogeno e Quaternário, sem diferenças significativas de especiação em cada período. Embora durante algum tempo, a hipótese mais invocada para explicar a diversificação Neotropical tenha sido a de formação de refúgios, segundo a qual a aridez gerada pelas glaciações do Quaternário teria favorecido a fragmentação de florestas em ilhas de savanas ou desertos, levando à especiação alopátrica (HOOGHIEMSTRA; VAN DER HAMMEN, 1998), dados de pólen indicam que a floresta

amazônica nunca passou por períodos de aridez e fragmentação e que esteve florestada desde o início do Pleistoceno (COLINVAUX et al., 2000). Isto fortaleceu a hipótese de que espécies Neotropicais apresentam uma origem predominantemente terciária (COLINVAUX; DE OLIVEIRA, 2001), e incentivou o debate sobre a idade das espécies neotropicais. Neste contexto, a partir do uso de filogenética molecular e de metanálises, Rull (2011) concluiu que: (1) um tema complexo como a diversificação neotropical não pode ser explicado em apenas um intervalo de tempo e através de um ou poucos processos (2) tanto processos paleogeográficos ocorridos no Paleogeno e no Neogénio quanto eventos paleoclimáticos ocorridos no Quaternário parecem ter exercido papel crucial na origem da biodiversidade no Neotrópico.

Dentro desta perspectiva mais realista dos padrões de especiação associados à origem da biodiversidade Neotropical, sugere-se que a divergência de muitos clados tenha iniciado nos períodos Paleogeno e Neogeno e continuado no Quaternário (RULL, 2011). Para alguns grupos, no entanto, os eventos de especiação podem ter ocorrido predominantemente nos períodos Paleogeno e Neogeno, enquanto para outros o Quaternário foi preponderante. Assim, por exemplo, para corais, a maior parte dos eventos de diversificação são datados para períodos pré-glaciais, enquanto para insetos, cerca de 75% das unidades evolutivas significativas (ESU – Evolutionary Significant Units) estudadas apresentam origem Glacial (RULL, 2008). Essas diferenças ocorrem devido a particularidades fisiológicas, ecológicas ou até mesmo históricas e geográficas, que fazem com que espécies diferentes sofram graus de impacto diferentes.

Em comum, tanto as hipóteses de origem e diversificação Quaternária quanto as de efeito Neogeno e Paleogeno consideram predominantemente a ocorrência de especiação alopátrica/parapátrica. Neste sentido, enquanto no Mioceno e no Plioceno ocorreram mudanças paleogeográficas que podem ter favorecido a ocorrência de eventos de vicariância (ZACHOS et al., 2001), no Pleistoceno, a fragmentação pode ter ocorrido como uma consequência direta (refúgios) ou indireta [distúrbio-vicariância e migração altitudinal (NOONAN; GAUCHER, 2006)] das alterações climáticas. No entanto, fatores ecológicos também devem ser considerados neste contexto, tanto pela possibilidade de especiação simpátrica (BOLNICK; FITZPATRICK, 2007), quanto de eventos de cladogênese positiva ou negativamente dependentes de densidade ou até mesmo cascatas filogenéticas (FORISTER; FELDMAN, 2011; WEIR et al., 2006).

Flutuações demográficas, subdivisões ou expansões populacionais também podem estar associadas a eventos paleo-geo-climáticos, deixando assinaturas importantes na diversidade genética e nos padrões evolutivos apresentados por diferentes populações ou espécies. Fatores associados às flutuações climáticas do Quaternário, por exemplo, causaram efeitos demográficos importantes em uma série de espécies Neotropicais, e assinaturas de expansão para períodos glaciais ou interglaciais são comumente encontrados em espécies habitantes de savanas ou florestas, respectivamente (FRANCO; MANFRIN, 2013; CENZI DE RÉ et al., 2014). Em ambiente aquático, por outro lado, as flutuações no nível do mar associadas às oscilações climáticas do Quaternário alteraram os níveis de estruturação populacional de espécies residentes em água salgada (ROMAN; PALUMBI, 2004), e em água doce (JOWERS et al., 2008). Neste caso, os efeitos da alternância de períodos de conexão e desconexão entre bacias podem ser evidenciados, por exemplo, nos padrões de estruturação apresentados por diferentes espécies de peixes de água doce (BRUNO et al., 2015). Os efeitos das regressões e transgressões marinhas sobre a PCRS (VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007) também deixaram assinaturas importantes em diferentes espécies de vertebrados, como peixes anuais da espécie *Austrolebias wolterstorffi* (GARCEZ, 2016) e em roedores (QUINTELA et al., 2015; GIBBON, 2016).

Independentemente dos processos associados à origem de toda esta biodiversidade, é consenso entre os especialistas que a maior parte das espécies Neotropicais permanece desconhecida. Este cenário é especialmente preocupante em face à atual crise de biodiversidade, que evidencia uma aceleração nas taxas de extinção de espécies em diferentes partes do globo (GIAM et al. 2013). É, pois, fundamental que haja um maior investimento em taxonomia alfa, que visa delimitar, descrever e nomear espécies. No entanto, em vista do impedimento taxonômico relacionado à escassez de taxonomistas clássicos e à grande demanda de tempo para atividades relacionadas à descrição de espécies (MOCZEK, 2010), é importante também que novas alternativas sejam propostas com o intuito de promover um maior conhecimento da nossa biodiversidade. O DNA Barcode é uma destas alternativas.

DNA Barcode

A atual lacuna no conhecimento de nossa biodiversidade existe por várias razões, mas está especialmente relacionada às limitações de amostragem, ao impedimento taxonômico, e à falta de conhecimento da distribuição geográfica de muitas espécies. A falta de dados de distribuição torna-se mais séria quando se considera espécies crípticas ou não descritas. Quando considerado no contexto de ações antrópicas em andamento (como por exemplo, a perda e a degradação de habitat), tal déficit de conhecimento pode mascarar "cripto-extinções". Estas ocorrem quando as espécies se extinguem antes de serem descobertas ou descritas (GIAM et al., 2013). Este problema é especialmente importante para grupos diversos e de tamanho corporal pequeno, como é o caso dos insetos. Nestes grupos, a identificação muitas vezes é difícil, não só pela vasta diversidade de espécies não descritas, mas também pela presença de espécies crípticas. A estes fatores, somam-se as dificuldades em atribuir caracteres diagnósticos a espécimes pertencentes a diferentes sexos ou fases de vida, e à variabilidade intraespecífica apresentada por alguns indivíduos do mesmo sexo no mesmo estágio do ciclo de vida (MOCZEK, 2010).

A necessidade de identificação mais rápida e eficiente de espécies, principalmente de insetos, vai além das "cripto extinções". A utilização de um método rápido e preciso de identificação é necessário não apenas para solucionar questões ligadas à biologia em geral. De fato, a identificação rápida e acurada de espécies é importante na resolução de questões relacionadas à saúde (na identificação de espécies com importância médica), à economia (na identificação de pragas de agricultura e pecuária e no manejo de estoques) e à conservação de espécies (no monitoramento ambiental, na identificação de espécies invasoras, no manejo de fauna, no controle do comércio ilegal de produtos biológicos ou espécies protegidas ou no tráfico de animais silvestres) (HEBERT et al., 2003).

O DNA Barcode é uma ferramenta excelente para a resolução dessas questões. A ferramenta foi proposta em 2003 por Hebert et al., e consiste na amplificação de um pequeno fragmento de DNA de 648 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), que pode ser utilizado como um "código de barras" padronizado e único, capaz de identificar tanto espécies já descritas quanto auxiliar na delimitação e na descoberta de novas espécies (Fig. 1).

O principal pressuposto para a efetividade do DNA Barcode é existência de *barcoding gap* (Figura 1), quando as distâncias intraespecíficas são menores que as distâncias interespecíficas. A

monofilia recíproca é o principal determinante para que o pressuposto ocorra. No entanto, é importante considerar que o tamanho efetivo populacional (N_e) afeta a eficiência da técnica de DNA barcode, pois afeta o tempo de coalescência entre os marcadores. Neste sentido, quanto maior o tamanho efetivo populacional, maior o tempo de coalescência e menor será a probabilidade de que duas populações ou espécies apresentem monofilia recíproca. Além do tamanho efetivo, o tempo desde a especiação é outro fator determinante na eficiência da técnica. De fato, espécies que divergiram recentemente frequentemente apresentam polimorfismos ancestrais compartilhados, devido ao fenômeno conhecido como *incomplete lineage sorting*. Por fim, é importante ainda considerar que a existência de maiores níveis de estruturação populacional afeta diretamente a diversidade intraespecífica (ORTIZ, 2010), levando, muitas vezes, à ausência de um barcoding gap, ou mesmo a monofilia recíproca entre agrupamentos populacionais.

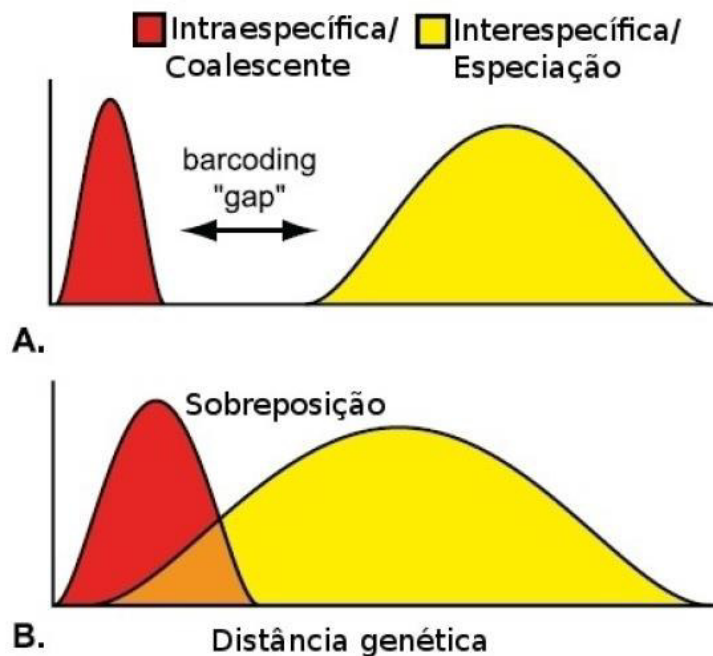


Figura 1. Demonstração do Barcoding gap (A) quando as distâncias intraespecíficas são menores do que as interespecíficas há a formação de um “gap”. Quando as distâncias intraespecíficas se sobrepõem as distâncias interespecíficas não há a formação de um “gap” e a técnica de DNA Barcode pode não ser efetiva (B). Fonte da imagem: MEYER; PAULAY (2005).

A técnica de DNA Barcode vem sendo amplamente utilizada para identificação molecular de diversos grupos de organismos, como insetos (MACHADO et al., 2017a), aranhas (BARRETT; HEBERT, 2005), peixes (WARD et al., 2005), aves (HEBERT et al., 2004) e mamíferos (ROBINS et al., 2007), chegando a taxas de eficiência de até 95%. Porém, há alguns estudos que sugerem uma eficiência menor da técnica, como em lepidópteros (KANDUL et al., 2004) e dípteros (MEIER et al., 2006). Estas divergências nas taxas de eficiência do DNA barcode podem ser explicadas por incongruências nas identificações morfológicas, devido a ambiguidades nas chaves de identificação, pela falta de taxonomistas capacitados para identificação morfológica de alguns grupos, pela existência de espécies fenotipicamente polimórficas (quando o número de espécies é superestimado) ou até mesmo pela ocorrência de espécies crípticas (quando o número de espécies é subestimado), o que é bastante comum entre insetos (ORTIZ, 2010).

Por outro lado, artefatos relacionados à amplificação de parálogos nucleares de genes mitocondriais (numt's) podem levar a superestimativa do real número de espécies (SONG et al., 2008; VYSKOČILOVÁ et al., 2018; TAY et al., 2017), enquanto varreduras seletivas associadas a um “efeito carona” de genes mitocondriais para com endossimbiontes citoplasmáticos (como a bactéria *Wolbachia*) podem levar a uma subestimativa do número de espécies (YASSIN et al., 2010). Neste contexto, torna-se cada vez mais importante a utilização de marcadores múltiplos, com herança independente, em associação com diferentes características morfológicas ou ecológicas. Essa associação de perspectivas é denominada taxonomia integrativa, e vem sendo cada vez mais defendida (JOSHI; AGARWAL, 2021; DAGLIO; DAWSON, 2019) e difundida (GARRAFONI et al., 2019; RIBEIRO et al., 2017). Além de evidenciar potenciais artefatos relacionados à aplicação da técnica de DNA Barcode, o uso concomitante de diferentes marcadores pode ser fundamental para diferenciar casos de especiação de situações envolvendo níveis mais pronunciados de estruturação populacional.

Estruturação Populacional

Estruturação populacional é o processo de subdivisão de uma população em subpopulações menores, onde ocorrem os cruzamentos (HARTL; CLARK, 2010). Cinco

principais forças evolutivas atuam quando uma população se encontra subdividida: mutação, recombinação, migração ou fluxo gênico, seleção natural e deriva genética. A migração é a força evolutiva responsável por manter a homogeneidade genética entre as subpopulações através da troca de alelos realizada pelos indivíduos migrantes. Quando uma subpopulação está geograficamente isolada das demais, a mutação e a recombinação tornam-se as únicas forças evolutivas capazes de levar ao surgimento de novos alelos (GRIFFITHS et al., 2013).

Segundo Hartl e Clark (2010), quando a população se encontra subdividida e isolada, as frequências alélicas das subpopulações são alteradas, de forma que a diferenciação entre elas é aumentada devido à ação da seleção natural a favor de diferentes genótipos em cada subpopulação ou devido a processos aleatórios que interferem na transmissão de alelos de uma geração para a seguinte. Além disso, o aumento nos níveis de endocruzamento em cada subpopulação acaba aumentando os níveis de homozigosidade e reduzindo a heterozigosidade geral da população. Muitas vezes, no entanto, algum nível de fluxo gênico é mantido entre o conjunto de subpopulações, quando os cruzamentos são controlados por mecanismos de isolamento por distância. Neste caso, os organismos tendem a reproduzir com indivíduos geograficamente mais próximos, o que altera as frequências alélicas e genotípicas das populações, levando a uma correlação entre os níveis de estruturação populacional e as distâncias geográficas entre as subpopulações (GRIFFITHS et al., 2013).

Em última análise, a estruturação populacional pode ocasionar a ocorrência e especiação parapátrica ou alopátrica (RIDLEY, 2006). Especiação parapátrica (Figura 2) ocorre, por exemplo, quando drásticas alterações ambientais ocorrem em uma região geográfica contínua durante tempo suficiente para criar isolamento genético das populações adjacentes. Especiação alopátrica e vicariância (Figura 3) ocorrem quando uma população é fragmentada devido ao surgimento de uma barreira física natural. Neste último caso, fatores históricos ou geográficos são comumente considerados os principais promotores de diversificação (HAFFER, 1997). Entre estes fatores, destacam-se: (1) vicariância tectônica, quando uma população endêmica ancestral é subdividida devido a eventos tectônicos (CRACRAFT; PRUM, 1988); (2) refúgios decorrentes de alterações paleoclimáticas, mais conhecido como a hipótese de refúgios, que sugere a alternância entre períodos de retração/vicariância e expansão populacional ao longo dos ciclos glaciais e interglaciais associados ao Quaternário como uma importante promotora

de diversificação (HAFFER, 1969); (3) o efeito de rios como barreiras ao fluxo gênico entre populações de espécies terrestres (PELLEGRINO et al., 2005) ou de istmos como barreiras ao fluxo gênico entre populações marinhas (GARCÍA-RÍOS et al., 2014); (4) gradientes ecológicos que fazem com que a diferenciação das espécies ocorra em áreas adjacentes, quando houver um limite ambiental acentuado entre elas (ENDLER, 1977).

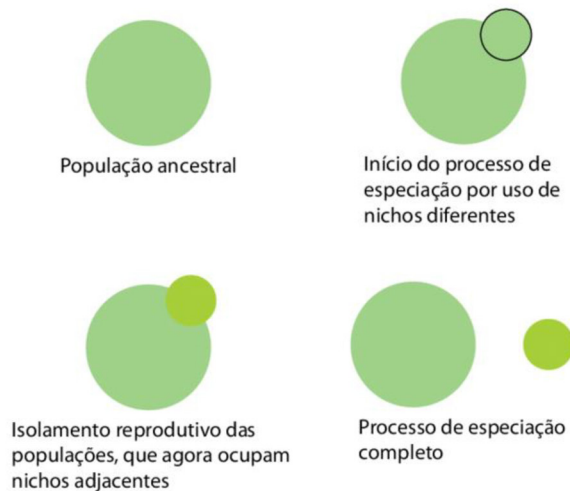


Figura 2. Esquema do processo de Especiação Parapátrica (Fonte: MELLO et al., 2012).

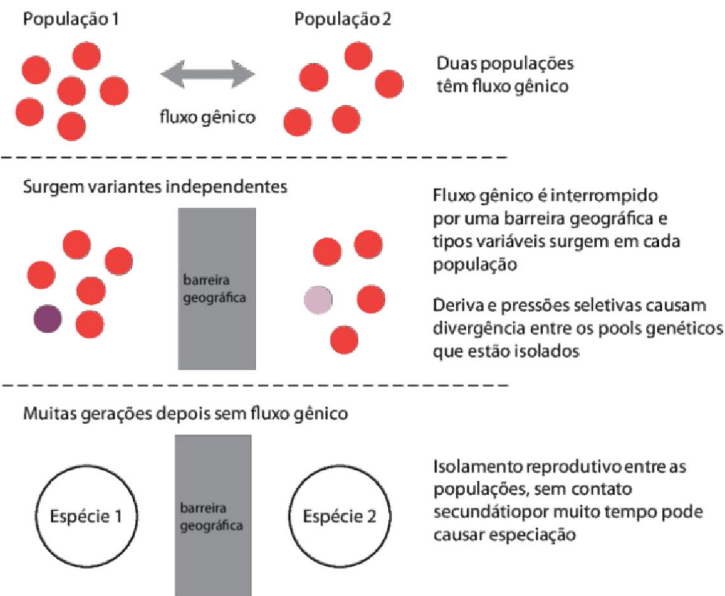


Figura 3. Esquema do processo de Especiação Alopátrica (Fonte: MELLO et al., 2012).

Como o processo de estruturação populacional pode culminar em especiação, muitas vezes é difícil traçar o limiar entre ambos os processos. Neste sentido, conceitos alternativos como o de Unidades Evolutivamente Significativas (ESU) (MORITZ, 1994) ou simplesmente o uso do termo “linhagem” vem sendo cada vez mais empregados. O uso destas alternativas tem revelado a presença de níveis crescentes de complexidade em diferentes componentes de nossa biota (GARCEZ et al., 2018; CASACCI et al., 2013). Dentro do contexto da presente tese, destacamos os insetos, que constituem um grupo dominante da biodiversidade global, tanto pela riqueza de espécies e pela ampla distribuição, quanto pela presença de variados níveis de estruturação populacional até mesmo entre espécies que co-ocorrem em uma mesma área (CENZI DE RÉ et al., 2014; MACHADO, 2017b; MOREIRA, 2020).

Insetos

Até 2005 foram descritas 1.004.898 espécies de insetos, apesar da estimativa total atingir mais de 5 milhões (SCUDDER, 2009). Insetos são considerados componentes-chave de qualquer ambiente, seja terrestre ou aquático, por possuírem um papel ecológico importante na ciclagem de nutrientes, na polinização de plantas, na dispersão de sementes, no controle biológico de outros organismos e na regulação da abundância de plantas com flores, além de serem fonte de alimento para diversas espécies (MAJER, 1987; BRUES, 1946). Dez ordens de insetos estão associadas a ambientes aquáticos: Trichoptera, Plecoptera, Ephemeroptera, Odonata, Megaloptera, Neuroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera. Destes, os dois últimos grupos representam uma porcentagem importante da diversidade de insetos aquáticos.

Diptera

A ordem Diptera é considerada a maior ordem de insetos, com cerca de 150.000 espécies distribuídas em quase todos os tipos de ambientes (YEATES et al. 2007). As formas larvais são caracterizadas pela ausência de apêndices articulados e os adultos são caracterizados pela redução do segundo par de asas em halteres, o que dá nome ao grupo (“Diptera” = um par de

asas) (HAMADA et al., 2014). Diptera está dividido em duas subordens: Brachycera caracterizados por antenas curtas e Nematocera caracterizados por antenas longas, geralmente com mais de seis segmentos. São representados, respectivamente, por moscas e mosquitos.

Nematocera (Ceratopogonidae)

A subordem Nematocera inclui os mosquitos e maruins, insetos holometábolos cujo ciclo de vida inclui as fases de ovo, até seis estágios larvais, pupa e adulto. As larvas podem ser aquáticas ou semi-aquáticas. Dentro desta subordem, a família Ceratopogonidae está inclusa na Infraordem Culicomorpha e compreende as espécies conhecidas como “maruins”, “meruins” ou “mosquitos-pólvora”. Há registros de fósseis em âmbar de representantes de Ceratopogonidae que datam de 17 a 121 milhões de anos (BORKENT; SPINELLI, 2007). Caracterizam-se pelo porte pequeno a médio (1-3mm), largura da asa de 0,4-7,0mm, ocelos ausentes, antenas com 13 flagelômeros, sendo que, nos machos, estas apresentam-se plumosas. As fêmeas podem apresentar mandíbulas denteadas, anepisterno dividido em porções anterior e posterior por meio da fenda anepisternal e pós-noto sem sulco médio longitudinal. As asas apresentam de 1 a 2 veias radiais com duas ramificações que chegam até sua margem. São sobrepostas sobre o dorso abdominal em repouso. As pernas anteriores são mais curtas que as posteriores, sendo que o primeiro tarsômero das pernas é igual ou mais longo do que o segundo. Esta família contém cinco subfamílias, 127 gêneros e 6.298 espécies, das quais quatro subfamílias (Leptoconopinae, Forcipomyiinae, Dasyheleinae e Ceratopogoninae), 31 gêneros e 424 espécies são encontradas no Brasil (HAMADA et al., 2014).

Culicoides

Entre as espécies que compõem a família, o gênero *Culicoides* (Figuras 4 e 5) representa as espécies com importância médica, veterinária e, conseqüentemente, econômica. São altamente adaptados a diferentes habitats, hematófagos e vetores de protozoários, nematóides e vírus, disseminando doenças que acometem humanos e animais. São responsáveis pela transmissão de vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Orbivirus* (CARPENTER et al., 2013; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE et al.,

2015). As principais doenças transmitidas por este grupo são: 1) *Bluetongue*, doença que acomete principalmente ovelhas, mas também bovinos, cabras, búfalos, veados, dromedários e antílopes. Caracteriza-se por uma infecção aguda com quadro febril, congestão e edema das vias aéreas, inflamação das unhas, inchaço e coloração azul na língua, condição que dá nome à doença (CASTELLÓN; VERAS, 2015). Geralmente apresenta-se de maneira assintomática no gado, mas quando acomete fêmeas grávidas provoca abortos e até a morte da fêmea e do feto; 2) Peste Equina Africana, que afeta cavalos, burros, mulas e zebras, mas eventualmente pode afetar cães. As formas mais graves da doença geralmente são apresentadas por cavalos e mulas, diferentemente das zebras que podem permanecer assintomáticas e são consideradas reservatórios naturais da doença na África. Apresenta quatro quadros clínicos: forma pulmonar, cardíaca, mista e febril. Pode levar à morte súbita (ROVID, 2015); 3) Febre Oropouche, que afeta humanos, é caracterizada por um quadro febril, tonteira, dores corporais leves, arrepios, dores de cabeça, fotofobia, conjuntivite, náuseas, vômitos, diarreia, tosse e coriza; raramente leva a óbito (PINHEIRO et al., 1981). Além da transmissão de doenças, a picada pode causar um importante desconforto incluindo dor local, edema, coceira intensa e sensação de queimadura (FORANTINNI, 1957).



Figura 4. *Culicoides bambusicola* ♂. Foto por: Thaísa Bozzetti.

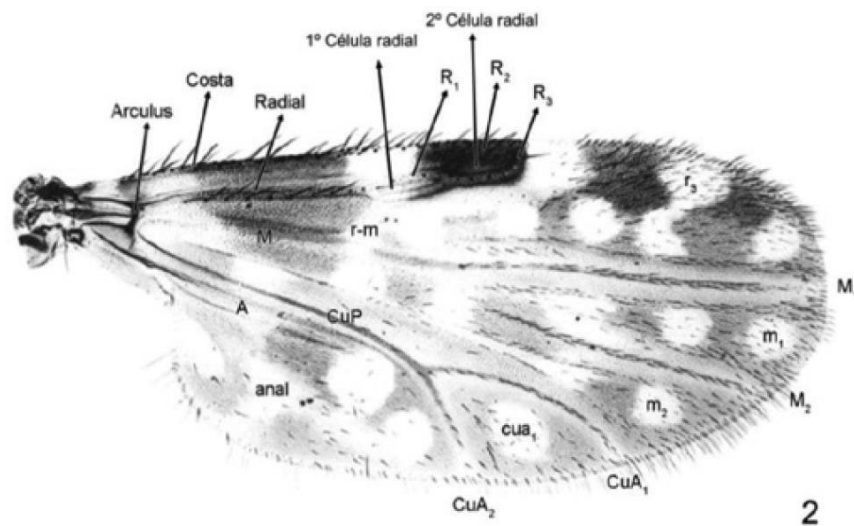


Figura 5. *Culicoides venezuelensis*, asa da fêmea mostrando venação e células (Fonte: CASTELLÓN; VERAS, 2015).

O ciclo de vida consiste em estágio de ovo, que geralmente dura de 2 a 10 horas, mas também podem entrar em latência por dias ou meses, quando expostos a condições ambientais adversas (DÍAZ et al., 2005); quatro estágios larvais vermiformes que podem durar dias ou meses e dependem principalmente da temperatura ambiental; estágio de pupa que pode durar horas e, finalmente, emergir o adulto de coloração clara que, após 24h, altera sua coloração devido ao processo de esclerotização. Em geral, o macho emerge antes da fêmea e seu esperma está pronto para reprodução 24h após a eclosão (CASTELLÓN; VERAS, 2015).

Culicoides está incluso na tribo Culicoidini, que pertence a subfamília Ceratopogoninae. A taxonomia de *Culicoides* vem sendo discutida desde 1937, com o trabalho de Root e Hoffman, que agruparam as espécies do gênero em duas séries: A e B, sendo seguida por Wirth (1952). Após, Khalaf (1954), Fox (1955), Forattini (1957), Borkent & Wirth (1997) e Borkent & Spinelli (2000) sugeriram outras subdivisões do gênero em subgêneros e grupos, até que no trabalho de Borkent & Spinelli (2007) foi sugerida a divisão do gênero *Culicoides* em 14 subgêneros (*Amossovia*, *Anilomyia*, *Beltranmyia*, *Cotocripus*, *Culicoides*, *Diphaomyia*, *Drysmodesmyia*, *Glaphiromyia*, *Haematomyia*, *Hoffmania*, *Macfiella*, *Mataemyia*, *Oecacta* e *Psychophaena*), 13 grupos (*acotylus*, *carpenteri*, *daedalus*, *dasyophrus*, *eublepharus*, *fluvialis*, *leoni*, *limai*, *monticola*, *pachymerus*, *reticulatus*, *stigmalis* e *stonei*) e mais algumas espécies sem grupos definidos.

As técnicas de identificação variam entre caracterização do padrão de manchas ou máculas das asas (comprimento e relação costal da asa) (Figura 6); forma e comprimento do 3º segmento do palpo e variabilidade do órgão sensorial do 3º segmento do palpo maxilar; separação dos olhos; relação de probóscide/cabeça; coloração das patas, comprimento dos segmentos tarsais e número de cerdas no pente tibial; coloração do tórax e dos halteres; número, comprimento e forma das espermatecas e forma da genitália masculina (CASTELLÓN; VERAS, 2015). Estas análises requerem bastante tempo para uma identificação precisa a nível de espécie, e são consideradas pouco efetivas na diferenciação entre espécies dentro dos complexos de espécies. Além disso, são extremamente tediosas, e podem não funcionar tão bem com espécies próximas, o que pode ocasionar em erros e gaps de identificações (LIU et al., 2018).

Devido à importância médica, veterinária e econômica que as espécies de *Culicoides* apresentam, é de suma importância que a identificação das espécies seja precisa e rápida, até mesmo para que haja um controle dos surtos de doenças em criações agropecuárias e comunidades. Ferramentas moleculares associadas à análise de caracteres morfológicos parecem ser excelentes ferramentas para simplificar este processo.

Ordem Hemiptera: Subordem Heteroptera

Hemiptera é constituída por aproximadamente 89 mil espécies descritas, divididas em quatro subordens: Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha (“Homoptera” = parafilético), Coleorrhyncha e Heteroptera (CARVER et al., 1991). Esta última é a maior e mais diversa subordem, apresentando cerca de 38.000 espécies descritas, das quais 5.000 estão presentes em meio aquático (POLHEMUS; POLHEMUS, 2008). A sinapomorfia que dá nome ao grupo é a presença de um “hemiélitro típico”, porém esta característica não é encontrada em algumas espécies, representando uma ideia tradicional entre antigos especialistas (SCHUH; SLATER, 1995; NIESER; MELO, 1997). Outras características do grupo são: 1) condição prognata com o lábio inserido bem à frente do prosterno, devido à presença de uma região gular esclerosada na parte ventral da cabeça; 2) redução do número de veias alares; 3) presença de um complexo aparato de glândulas de cheiro, ventral nos adultos e dorsal nas ninfas (CARVER et al., 1991) e 4) redução do tentório (FORERO, 2008).

Heteroptera apresenta espécies distribuídas ao longo de todo globo, com exceção da Antártida, e é dividida em sete infraordens: Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Cimicomorpha, Pentatomomorpha, Leptopodomorpha, Gerromorpha e Nepomorpha (SCHUH; SLATER, 1995). Os três últimos grupos são encontrados em meio aquático, seja nas margens dos corpos d’água, como é o caso dos Leptopodomorpha, ou através de espécies verdadeiramente aquáticas, que em Gerromorpha permanecem na superfície da água, e em Nepomorpha habitam o fundo ou a coluna d’água (HAMADA et al., 2014). Em relação ao ciclo de vida, possuem desenvolvimento hemimetábolo, apresentando normalmente cinco estágios de ninfa que se assemelham aos adultos, porém são menores, sem distinção de genitália e sem

315 asas. Ainda assim, as ninfas compartilham o mesmo hábitat e comportamento que os adultos
316 (WILLIAMS; FELTMATE, 1992).

317 **Nepomorpha**

318 Os representantes dessa infraordem possuem adaptações morfológicas ao meio
319 aquático, seja para ambientes lênticos, lóticos ou até mesmo para praias costeiras
320 (MCCAFFERTY, 1981). Estas adaptações incluem a presença de antenas curtas e escondidas
321 sob os olhos (MAHNER, 1993; SCHUH; SLATER, 1995), que podem funcionar como órgãos
322 de equilíbrio, entrando em contato com a bolha de ar abaixo dos olhos e percebendo as
323 alterações de posição pelos órgãos de Johnston (NIESER; MELO 1997) e a presença de pernas
324 posteriores em formato de remos para natação. Além destes, outros caracteres também definem
325 a infraordem: rostro geralmente pequeno e robusto, com três ou quatro segmentos; pronoto
326 longo, cobrindo o meso e metanoto e escutelo sempre exposto (PANIZZI; GRAZIA, 2015). O
327 tamanho corporal varia entre 1mm (Pleidae e Helotrephidae) a 130 mm (Belostomatidae). São
328 excelentes predadores de tocaia, permanecendo entre a vegetação, como ocorre com espécies
329 de Belostomatidae (PEREIRA; MELO, 1998). A Região Neotropical abriga a maioria das
330 espécies deste grupo (730 das mais de 2.300 espécies descritas para os 133 gêneros)
331 (POLHEMUS; POLHEMUS, 2008).

332 Segundo Schuh e Slater (1995), este grupo apresenta polimorfismo alar, onde indivíduos
333 de uma mesma espécie podem ser macrópteros (presença de asas e músculos para voo bem
334 desenvolvidos) ou braquípteros (presença de asas reduzidas ou não funcionais). Neste caso, o
335 polimorfismo alar é determinado através da regulação do hormônio juvenil e ecdisona (ZERA;
336 DENO, 1997), sendo sua frequência diretamente proporcional à diversidade de habitats
337 (VEPSÄLÄINEN, 1973) e a densidade de indivíduos. Este último fator parece ser uma
338 adaptação importante para evitar competição (PAJUNEN; JANSSON, 1969), com ambientes
339 temporários apresentando maior razão de indivíduos alados e ambientes permanentes
340 apresentando maior razão de indivíduos braquípteros (VEPSÄLÄINEN, 1973). A migração
341 destes indivíduos ocorre principalmente através do vôo, cuja frequência varia no espaço ou no
342 tempo (VEPSÄLÄINEN, 1973) ou mesmo em função da atividade reprodutiva. Neste último

aspecto, fêmeas tendem a perder a habilidade de vôo para melhor alocação de recursos para produção de ovos, o que não ocorre com machos, onde o vôo aumenta a probabilidade de encontrar uma parceira (ROFF, 1990).

Estas características tornam os heterópteros excelentes modelos para estudos filogeográficos, principalmente de um ponto de vista comparativo. Como o polimorfismo alar em heterópteros aumenta de acordo com o tipo de habitat, as drásticas mudanças geológicas e climáticas que ocorreram no Neotrópico devem ter exercido influências distintas entre espécies de Nepomorpha, tornando os heterópteros aquáticos excelentes modelos para estudos de estruturação populacional.

Belostomatidae

Conhecidos como Electric Light Bugs por serem atraídos pela luz elétrica, são proximamente relacionados com Nepidae, com os quais compartilham similaridades na genitália masculina, com o ápice do falo totalmente esclerotizado, nos apêndices respiratórios, e na musculatura abdominal (LAUCK; MENKE, 1961). O monofiletismo de Belostomatidae é corroborado pela presença de sífões respiratórios retráteis, uma sinapomorfia desta família (CHINA, 1955; LAUCK; MENKE, 1961). São excelentes predadores de tocaia e alimentam-se de uma variedade grande de recursos como larvas de insetos (CONSOLI et al., 1989; PEREIRA et al., 1991), anuros (HINSHAW; SULLIVAN, 1990) e até alevinos de peixes. De fato, estas espécies podem infestar criadouros de peixes, apresentando importância econômica. Em Belostomatini, a fêmea faz a oviposição dos ovos no dorso do corpo do macho (Figura 6) (USINGER, 1968), para evitar que os ovos sejam predados, e também para aumentar a oxigenação dos ovos devido aos movimentos que o macho faz com as pernas posteriores.



Figura 6. Macho de Belostomatidae carregando os ovos no dorso (Foto: Tom D. Schultz).

365 A família é composta por três subfamílias: Belostomatinae com seis gêneros
 366 (*Belostoma*, *Diplonychus*, *Hydrocyrius*, *Limnogeton* e *Abedus* e *Weberiella*); Lethocerinae
 367 (incluindo os gêneros *Lethocerus*, *Kirkaldyia* e *Benacus*) e Horvathinae (com um gênero
 368 cada: e *Horvathinia*, respectivamente). A maioria dos estudos filogenéticos para a família
 369 utilizou apenas caracteres morfológicos, exceto o estudo de Ribeiro et al. (2017) que utilizou
 370 uma abordagem multi-locus associada a uma análise de caracteres morfológicos (Figura 7).
 371 Este estudo resolveu algumas questões entre as subfamílias, como a divisão entre Lethocerinae
 372 e Belostomatinae (incluindo *Horvathinia*) em dois grupos monofiléticos. O posicionamento de
 373 *Weberiella* como grupo irmão de *Abedus*, além da reformulação de Belostomatini e a monofilia
 374 de Diplonychini trib. Nov. (*Appasus* + *Diplonychus*) foram recuperados com alto suporte.
 375 Apesar deste trabalho ter resolvido uma série de questionamentos importantes dentro da família,
 376 outras relações filogenéticas continuam em discussão, como àquelas apresentadas entre
 377 espécies de *Belostoma*.

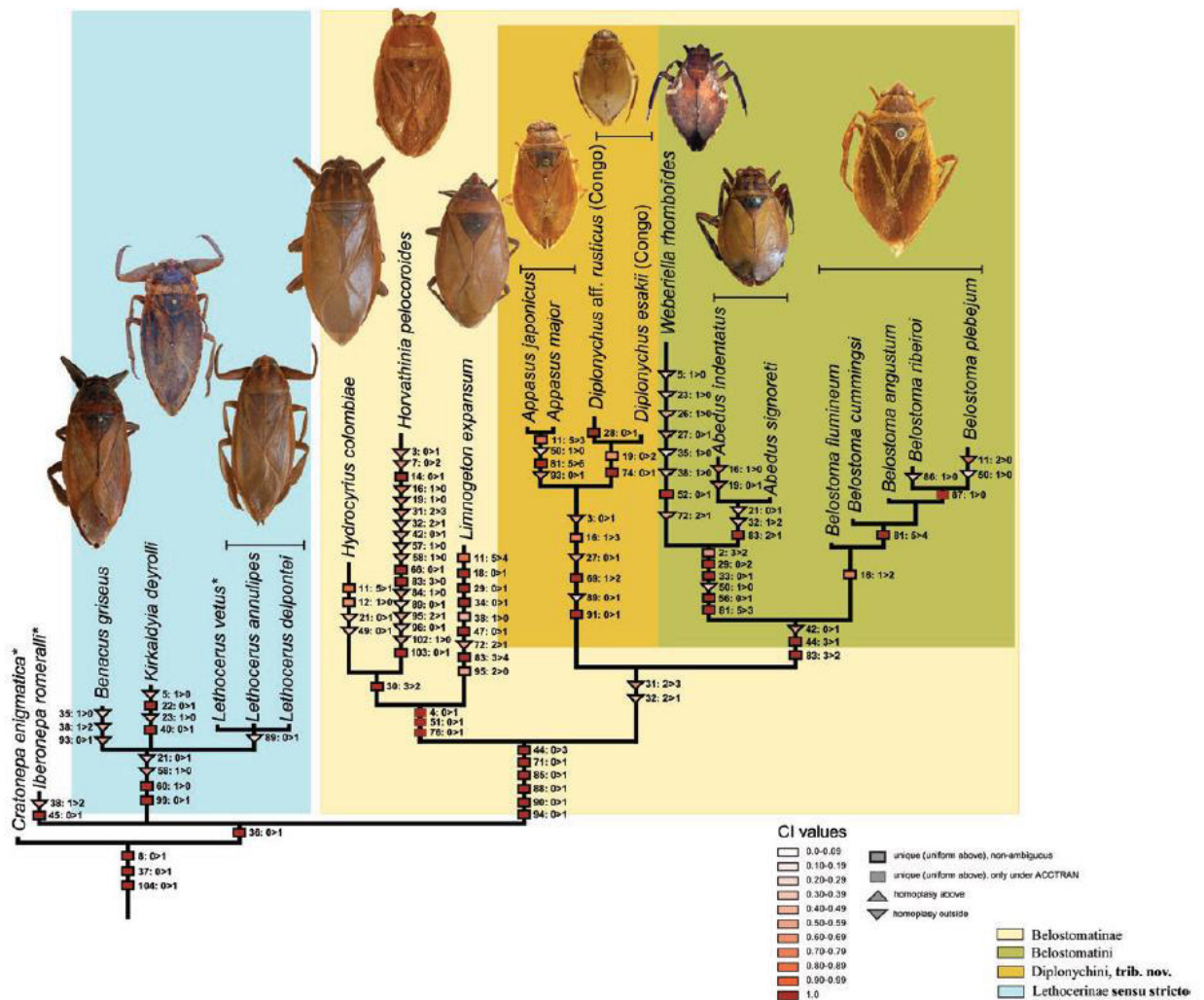


Figura 7. Filogenia recuperada por Ribeiro et al. (2017) em uma abordagem integrativa associando caracteres morfológicos a uma análise molecular multi-locus.

O gênero *Belostoma* é o mais especioso em Belostomatidae, compreendendo 74 espécies, 46 das quais ocorrem no Brasil (MOREIRA et al., 2011). Em geral, o gênero compreende organismos de difícil identificação morfológica, devido à falta de chaves de identificação que abranjam ambos os sexos. Além disso, como o falo é a estrutura taxonômica geralmente usada para a identificação de espécies morfológicamente semelhantes, há uma dificuldade inerente na identificação de fêmeas e ninfas. Esses fatores, juntamente com a variabilidade intraespecífica, tornam o gênero um alvo de grandes incongruências taxonômicas.

Belostoma é tradicionalmente subdividido em 16 grupos distribuídos em três agrupamentos de acordo com as categorias de tamanho corporal (LAUCK, 1962): espécies grandes (26,0 a 50,0 mm de comprimento), espécies de tamanho médio (15,5 a 26,0 mm de comprimento) e espécies pequenas (9,5 a 22,0 de comprimento). Entre eles, os grupos *Belostoma testaceopallidum* sensu LAUCK (1963) (3 spp.) e *Belostoma dentatum* sensu Ribeiro et al. (2017) grupos (17 spp.) são considerados de grande porte; os grupos *Belostoma bifoveolatum* sensu LAUCK (1964) (3 spp.) e *Belostoma flumineum* sensu LAUCK (1964) (4 spp.) abrangem espécies de tamanho médio; e os grupos *Belostoma oxyurum* sensu RIBEIRO; ESTÉVEZ (2009) (7 spp.), *Belostoma plebejum* sensu RIBEIRO; ALECRIM (2008) (7 spp.) e *Belostoma denticolle* sensu ESTÉVEZ; POLHEMUS (2001) (4 spp.) são de tamanho pequeno.

Dada a alta diversidade e complexidade morfológica de *Belostoma* e de *Culicoides*, as ferramentas de avaliação molecular provavelmente fornecerão informações úteis para resolver questões taxonômicas. O DNA Barcoding, por exemplo, pode contribuir significativa para essa tarefa, ao permitir a identificação de espécies descritas e não descritas por meio de um pequeno fragmento de DNA que, em última análise, funciona como um “código de barras” (HEBERT et al., 2003). Além disso, embora ambos os gêneros sejam abundantes na região Neotropical, os padrões de diversidade genética associados a sua distribuição ainda não foram estudados em detalhes, levando à expectativa de altos níveis de estruturação populacional e até mesmo diversidade críptica, em alguns casos, contrastados pela homogeneidade imposta por altos níveis de fluxo gênico em outros. Por fim, o sequenciamento de diferentes marcadores moleculares com vistas à identificação ou à delimitação de espécies também deve permitir a geração de dados importantes para a inferência das relações filogenéticas entre espécies. Em todos os casos, para esta tese, os diferentes questionamentos foram direcionados majoritariamente para espécimes/espécies coletadas no Bioma Pampa, em especial, na Província Costeira do Rio Grande do Sul.

Bioma Pampa

Também chamado de Campos Sulinos, este bioma está presente em três países da América do Sul: Argentina (Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Entreríos e Corrientes), na

República Oriental do Uruguai e no Brasil. Neste último país, o Bioma Pampa ocorre apenas no estado do Rio Grande do Sul, onde representa cerca de 63% do território. Este bioma é bastante explorado para fins pecuários, destacando-se como a região responsável pela maior produção pecuária brasileira a longo dos últimos 300 anos.

O Bioma Pampa é formado por um mosaico de formações ecológicas, tendo como principais formações os campos, matas ciliares (de galeria), capões de mato e matas de encostas (SUERTEGARAY; SILVA, 2009). O clima temperado influencia na paisagem do Pampa, com frentes frias frequentes chegando entre junho e setembro. Neste período, registram-se as temperaturas mais frias do ano, que chegam a 0°C e contrastam com a temperatura encontrada nos meses de dezembro a março, que atingem médias de 24°C (SUERTEGARAY, 1998). As precipitações variam entre 1.250 e 1.500 mm, não havendo uma estação seca (CORDEIRO; SOARES, 1977). A vegetação de crescimento secundário (lenhosas de porte arbóreo e arbustivo, como matas de galeria e ciliares) sobre um tapete campestre é favorecida pelo clima úmido característico. A vegetação prostrada (gramíneas) também compõe a paisagem do Bioma Pampa.

No que se refere a hidrografia, o Bioma Pampa é constituído principalmente por duas bacias hidrográficas: a bacia hidrográfica Costeira do Sul e a bacia hidrográfica do Rio da Prata (SUERTEGARAY; SILVA, 2009). Os principais rios são Rio Uruguai, Rio Santa Maria, Rio da Prata, Rio Jacuí, Rio Ibicuí e Rio Vacacaí.

Geomorfologia do Bioma Pampa

O Bioma Pampa encontra-se subdividido em cinco regiões geomorfológicas: a Campanha, a Formação Botucatu, a Depressão Central, a Serra do Sudeste e a Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS). Cada uma destas regiões apresenta formações e topografias distintas, que caracterizam ambientes propícios ao desenvolvimento de fitofisionomias levemente diferenciadas (SUERTEGARAY; SILVA, 2009).

Segundo Ab'Saber (1969), a Campanha é uma região interplanáltica típica, que varia de 200 a 220 m de altitude nas margens e de 140 a 180m no centro. Teve origem de uma estrutura

geológica regional homoclinal, aplainada e desgastada pela rede hidrográfica do Rio Jacuí e pelo Rio Santa Maria. É caracterizado pela presença de ondulações no solo, denominadas de “coxilhas”, que se formaram devido a umidificação do clima.

A formação Botucatu tem formação Mesozóica (Triássico), com 220 milhões de anos, sendo constituída por arenitos resultante da deposição eólica, que se estendem por toda a Bacia do Paraná. Neste momento, a paisagem do RS era dominada por planícies com pequenas ondulações e grandes, mas rasos corpos d’água, que frequentemente representavam refúgios para a sobrevivência de diferentes espécies (HOLZ, 1999). O clima era árido, intercalado por chuvas torrenciais que formavam grandes enchentes. Esta paisagem sofreu grandes mudanças por meio dos movimentos tectônicos e pelo vulcanismo de fissuras em toda a bacia do Paraná, onde iniciou a fragmentação da Pangeia. Assim, devido ao aquecimento climático, paisagens de lagos e rios do Triássico deram lugar aos sedimentos de origem eólica. Do período vulcânico teve origem as paisagens planas totalmente formadas por basalto, que hoje recebem o nome de Serra Geral e compõe o Planalto Meridional.

A Depressão Central situa-se no Escudo Granítico, com altitudes variando entre 40-200m. É o domínio de sedimentos gondwânicos e consiste em amplas planícies aluviais e coxilhas sedimentares. As áreas planas são utilizadas para o plantio de arroz e agropecuária, enquanto as demais áreas são utilizadas para agricultura diversa (trigo, soa, milho, mandioca, etc.) (BOLDRINI, 1997).

A Serra do Sudeste, também conhecida como Escudo Sul-Riograndense, é uma região fortemente ondulada, com altitudes variando entre 200 a 500m. É a região mais antiga do estado. O substrato é constituído principalmente por granito, mas também por gnaiss, arenito e sedimentos. A vegetação é representada pela floresta estacional semi-decidual associada a savana (BOLDRINI, 1997).

A Planície Costeira formou-se desde o Triássico, mas foi bastante retrabalhada, especialmente em sua área mais a leste, durante o período Quaternário, quando ocorreram ciclos transgressivos-regressivos do nível do mar (ver pág. 40; linhas 512-519). Esta região geomorfológica corresponde a uma faixa arenosa constituída por cordões de lagunas e lagoas, que se estendem de Torres a Santa Vitória do Palmar.

A província costeira do Rio Grande do Sul

Embora a maior parte do debate acerca da origem da biodiversidade Neotropical esteja centrada nos períodos Paleogeno, Neogeno e Quaternário, eventos geológicos anteriores estabeleceram os alicerces para esta evolução. A região costeira do Brasil Meridional ou província costeira do Rio Grande do Sul, por exemplo, vem sendo trabalhada desde o início do Triássico, há cerca de 250 a 200 milhões de anos, quando nas margens continentais da América do Sul e da África (CESERO; PONTE, 1997) ocorreu o grande evento tectônico conhecido como Reativação Wealdeniana, que fez com que surgisse, através do processo de rifting, uma grande bacia alongada longitudinalmente, chamada de Depressão Afro-Brasileira. Eventos posteriores a este culminaram na formação da costa Atlântica, que tem origem Jurássica (RIBEIRO, 2006), e na separação completa dos continentes africano e sul-americano, que ocorreu há cerca de 98 a 93 milhões de anos atrás (fim do Cretáceo médio) (CESERO, PONTE, 1997), com o ápice das atividades magmáticas no Eoceno e no Oligoceno. O desenvolvimento posterior desta região costeira foi condicionado pela dinâmica global, envolvendo principalmente a tectônica de placas, o clima e as variações do nível do mar, e pela dinâmica costeira, envolvendo os ventos, as ondas e as correntes litorâneas que atuam diretamente na transformação da morfologia das praias arenosas (VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007).

Com relação a tectônica de placas, como a costa pacífica da América do Sul encontra-se sobre uma margem continental ativa com intensa atividade tectônica e vulcânica (resultado do cavalgamento da placa Sul-Americana sobre a Placa de Nazca), grande quantidade de material detrítico acaba sendo levado para a costa atlântica, que é mais baixa e está situada sobre uma margem continental passiva (VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007). O acúmulo de sedimento proveniente da costa pacífica auxilia no desenvolvimento de extensas planícies costeiras na costa atlântica, em especial em sua porção sul, que é marcada por grande calma tectônica, e caracterizada por um complexo de barreiras arenosas, campos de dunas e lagunas. Do ponto de vista climático, entretanto, ao longo dos últimos dois milhões de anos, a evolução desta região vem sendo bastante afetada pelas variações cíclicas na temperatura da terra, conhecidos como ciclos de Milankovitch, que geram oscilações no nível do mar de acordo com as mudanças orbitais e axiais da Terra (IMBRIE et al., 1992).

A Província Costeira do Rio Grande do Sul é composta por dois grandes compartimentos geomorfológicos: as Terras Altas, que agrupam parte do Escudo Sul-Rio-Grandense, da Depressão Central Gaúcha e do Planalto das Araucárias; e as Terras Baixas, que agrupam a Planície Costeira e a Plataforma Continental. Através da dinâmica costeira, as Terras Altas frequentemente movimentam sedimentos para as Terras Baixas (VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007).

A Planície costeira do Rio Grande do Sul

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) é constituída por uma ampla área sedimentar que se estende por 640 km, desde o município de Torres até a Barra do Chuí. Está localizada sobre o Cinturão Dom Feliciano, entre os crátons Rio da Prata (metade Sul do estado) e Luiz Alves (no limite do RS com SC). Possui ampla variabilidade de ambientes, como campos, banhados, lagoas, dunas, marismas e uma extensa praia arenosa (GIANUCA, 2009).

A formação da PCRS começou no período Neogeno, com a acumulação de sedimentos de processos gravitacionais, como a queda livre de blocos, o rastejamento e o fluxo de detritos, que formaram um sistema de leques aluviais ao longo da margem oeste da planície. Este acúmulo de sedimentos foi sendo retrabalhado durante o período Quaternário, através da influência de sucessivos ciclos transgressivos-regressivos decorrentes das variações do nível do mar durante as últimas quatro glaciações, levando a formação dos quatro sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira (Figura 8). Destes, os três primeiros foram formados durante o Pleistoceno e o último, mais recente, foi formado durante o Holoceno (TOMAZELLI; VILLWOCK, 2005).

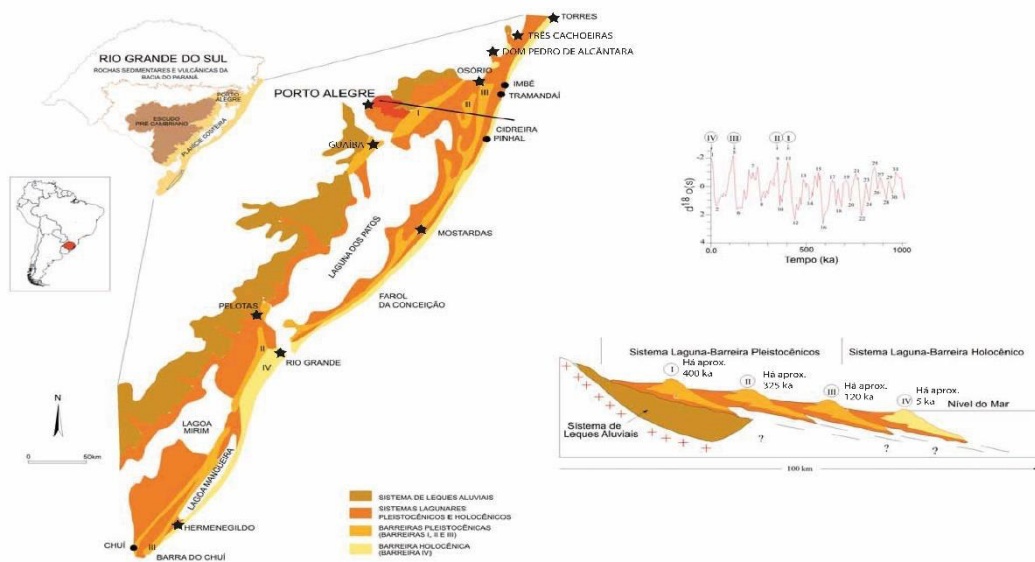


Figura 8. Planície Costeira do Rio Grande do Sul, com detalhamento de sua formação histórica. Adaptado de VILLWOCK; TOMAZELLI (2007).

A progressão destas barreiras gerou o isolamento dos Sistemas Patos/Mirim/Mangueira e de outras lagoas costeiras situadas na linha da costa, alternando ambientes terrestres e estuarinos com ambientes fluviais, lagunares, eólicos, marinhos e transicionais, constituindo a grande diversidade de ambientes da PCRS. Em nível biológico, o impacto destes eventos e destas formações vem sendo detectado principalmente em vertebrados. Para peixes anuais de *Austrolebias wolterstorffi*, por exemplo, populações pertencentes à bacia La Plata e ao sistema de drenagens Patos-Mirim apresentam evidências de fragmentação alopátrica, com 76% da variação sendo encontrada entre diferentes populações (GARCEZ, 2016). Nesta espécie, foi demonstrada a presença de seis subpopulações claramente subdivididas em duas linhagens, localizadas a leste e a oeste da Lagoa dos Patos, com um padrão de colonização espaço-temporal compatível com a formação dos sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira que afetaram a região durante o Quaternário (GARCEZ et al., 2018). Para *Scapteromys tumidus*, uma espécie de roedor endêmica do bioma Pampa, que ocupa regiões de vegetação úmida próximos a cursos de água como pântanos, lagoas, pequenos riachos e grandes rios (OVERBECK et al., 2007), Quintela et al. (2015) encontraram uma subdivisão em dois grandes clados, com expansão demográfica entre 350 e 300ma, data que coincide com a formação do Sistema Laguna Barreira

II e com o consequente aumento na área continental da Costa do Rio Grande do Sul. Para o roedor *Cavia magna*, Gibbon (2016) demonstrou a presença de duas populações distintas, evidenciando que a Laguna dos Patos atua com uma barreira ao fluxo gênico entre as populações ao Sul e ao Norte de sua desembocadura.

No entanto, estudos buscando avaliar o efeito dos eventos paleogeoclimáticos responsáveis pela formação da PCRS sobre a estruturação populacional de invertebrados ainda são extremamente escassos. Espera-se, neste caso, que os padrões evidenciados variem entre táxons, como reflexo das diferenças nos níveis de associação a ambientes aquáticos, e do quanto áreas inundadas ou terrestres representam uma barreira ao fluxo gênico de suas populações. Insetos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Culicoides* e *Belostoma*, são especialmente promissores para estudos deste tipo, em vista de sua grande diversidade e versatilidade ecológica, sua abundância em diferentes habitats e seu ciclo de vida curto, com maior número de gerações por intervalo de tempo.

Justificativa e objetivos da tese

Como mencionado na introdução geral da tese, as ordens Diptera e Hemiptera são duas das ordens mais diversas dentro de Insecta. No entanto, ambos impõem desafios no que se refere ao processo de identificação morfológica de seus representantes, seja devido à escassez de profissionais capacitados, pela escassez de chaves de identificação ou até mesmo pela presença de espécies crípticas. Isso resulta em incongruências no número de espécies descritas e aumenta a probabilidade de cripto-extinções. Com isso, uma técnica mais simples, rápida e eficaz se faz necessária para a identificação e delimitação mais precisa para as espécies destes grupos.

A técnica do DNA Barcode parece ser uma excelente ferramenta para estes fins, principalmente no caso de grupos de tamanho corporal pequeno e que apresentem complexos de espécies ou espécies crípticas como é o caso dos gêneros *Culicoides* e *Belostoma*. Estes dois gêneros ainda não tem as relações filogenéticas entre as espécies bem elucidadas. A maioria dos estudos sobre as relações filogenéticas ou identificação molecular de *Culicoides* não inclui as espécies avaliadas nesta tese. O mesmo ocorre com *Belostoma*, que apresenta apenas um trabalho tratando do seu posicionamento filogenético dentro de Belostomatidae, que não inclui, portanto, a maior parte das suas espécies. Devido ao impedimento taxonômico marcante destes dois grupos e

da ampla abundância e distribuição destas espécies, há a necessidade de aplicação da técnica de DNA Barcode para a confirmação das espécies já descritas e a delimitação de potenciais espécies novas, se for o caso.

Além disso, devido às diferentes capacidades de dispersão das espécies de *Belostoma* e à ampla distribuição das espécies, especialmente as observadas no grupo de *Belostoma angustum*, os padrões de estruturação populacional destas espécies são extremamente intrigantes. O Rio Grande do Sul parece ser uma excelente área de estudo para isso, pois apresenta alta variabilidade de ambientes e diferentes altitudes como regiões de planalto e planície. Além disso, o processo de formação da planície costeira também pode ter atuado sobre a estruturação populacional desta espécie. Sabe-se que *B. angustum* apresenta alta capacidade de dispersão, mas ainda não se sabe o quanto a espécie é capaz de voar e se a altitude pode atuar como barreira para a dispersão dessa espécie, resultando em um maior potencial para especiação alopátrica.

Com base nas informações acima, o objetivo geral da tese foi analisar a diversidade taxonômica e os padrões associados à evolução de espécies de *Belostoma* e *Culicoides* da PCRS. Para isso, foram abordados os seguintes objetivos ao longo dos capítulos: i) comparar as delimitações de espécies obtidas por abordagens morfológicas e moleculares, a fim de testar a eficiência do DNA Barcoding na identificação e delimitação de espécies de *Belostoma*, especialmente em relação às espécies de tamanho corporal pequeno, como aquelas pertencentes ao grupo *Belostoma oxyurum*. ii) analisar os padrões de estruturação populacional de *B. angustum* em diferentes regiões geomorfológicas do Bioma Pampa; iii) avaliar a monofilia recíproca e as relações filogenéticas entre espécies de *Culicoides* presentes na PCRS por meio da associação de marcadores morfológicos relacionados às máculas e manchas das asas e marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER A. N. Participação de Superfícies Aplainadas nas Paisagens do Rio Grande do Sul – Geomorfologia. **Instituto de Geografia (Universidade de São Paulo)**, v. 11, p. 17, 1969.
- BARRETT, R. D.; HEBERT, P.D. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 481–491, 2005.
- BOLDRINI, I.I. **Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática Ocupacional**. Porto Alegre: Boletim do Instituto de Biociências, 1997.
- BOLNICK, D. I.; FITZPATRICK, B. M. Sympatric Speciation: Models and Empirical Evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 38, p. 459–87, 2007.
- BORKENT, A.; SPINELLI, G. R. Catalog of the new world biting midges south of the united states of America (Diptera: Ceratopogonidae). **Contribution on Entomology, International**, v. 4, n. 1, p. 1- 106, 2000.
- BORKENT, A.; SPINELLI, G.R. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In ADIS, J.; ARIAS, J. R.; RUEDA-DELGADO, G.; WANTZEN, K. M. **Aquatic biodiversity in Latin America**, Sofia-Moscow: Pensoft, 2007.
- BORKENT, A.; WIRTH, W.W. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. n. 233, p. 1-257, 1997.
- BRUES, C. T. **Insect Dietary: An Account of the Food Habits of Insects**. Cambridge: Harvard University Press, 1946.
- BRUNO, M. C.; CASCIOTTA, J. R.; ALMIRÓN, A. E.; RICILLIO, F. L.; LIZARRADE, M. S. Quaternary refugia and secondary contact in the southern boundary of the Brazilian subregion: comparative phylogeography of freshwater fish. **Vertebrate Zoology**, v. 65, p. 45-55, 2015.
- CARPENTER, S.; GROSCHUP, M. H.; GARROS, C.; FELIPPE-BAUER, M. L.; PURSE, B. V. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. **Antiviral Research**, v. 100, n. 1, p. 102-113, 2013.
- CARVER, M.; GROSS, G.F.; WOODWARD, T.E. Hemiptera. In: CSIRO (Ed.). **The Insects of Australia, a Textbook for Students and Researchers**. New York: Melbourne University Press and Cornell University Press, 1991.

615 CASACCI, L. P.; BARBERO, F.; BALLETO, E. The “Evolutionarily Significant Unit”
 616 concept and its applicability in biological conservation. **Italian Journal of Zoology**, v. 81, n.
 617 2, p. 182-193, 2013.

618 CASTELLÓN, E. G.; VERAS, R. S. **Maruins (Culicoides: Ceratopogonidae) na Amazônia**
 619 **Brasileira**. Manaus: Editora INPA, 2015

620 CENZI DE RÉ, F.; GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS,
 621 R. P.; LORETO, E. L. S.; ROBE, L. J. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons*
 622 (Diptera: Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the
 623 Last Glacial Maximum. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 112, p. 55–66, 2014.

624 CESERO, P.; PONTE, F. C. Análise comparativa da paleogeologia dos litorais atlânticos
 625 brasileiro e africano. **Boletim de Geociências**, v. 11, n. 1-2, p. 1–18, 1997.

626 CHINA, W.E.; MILLER, N.C.E. Check-list and keys to the families and subfamilies of the
 627 Hemiptera-Heteroptera. **Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology**, v.
 628 8, p. 1-45, 1959.

629 COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P.E. Amazon plant diversity and climate through the
 630 Cenozoic. **Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology**, v. 166, n. 1-2, p. 51–63, 2001.

631 Colinvaux, P.A.; de Oliveira, P.E.; Bush, M.B. Amazonian and neotropical plant communities
 632 on glacial time scales: The failure of the aridity and refuge hypothesis. *Quaternary Science*
 633 *Reviews*, v. 19, p. 141–169, 2000.

634 CONSOLI, R. A. G. B.; PEREIRA, M. H.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. *Belostoma*
 635 *micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes*
 636 *fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. **Memorias do Instituto Oswaldo**
 637 **Cruz**, v. 84, n. 4, p. 577-578, 1989.

638 CORDEIRO, C. A.; Soares L. C. A erosão nos solos da região sudoeste do Rio Grande do Sul.
 639 **Revista Brasileira de Geografia**, v. 39, p. 82-150, 1977.

640 CRACRAFT, J.; PRUM, R. O. Patterns and processes of diversification: speciation and
 641 historical congruence in some neotropical birds. **Evolution**, v. 42, p. 603-620, 1988.

642 DAGLIO, L. G.; DAWSON, M. Integrative taxonomy: Ghosts of past, present and future.
 643 **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 99, n. 6, p. 1237-
 644 246, 2019.

645 DÍAZ, F.; RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G. R. The immatures of the Neotropical species
646 *Culicoides venezuelensis* Ortiz & Mirsa (Diptera: Ceratopogonidae). **Transactions of the**
647 **American Entomological Society**, v. 131, n. 1-2, p. 1-20, 2005.

648 ENDLER, J. A. **Geographic Variation, Speciation, and Clines**. Princeton: Princeton
649 University Press, 1977.

650 ESTÉVEZ, A. L.; POLHEMUS, J. T. The small species of *Belostoma* (Heteroptera,
651 Belostomatidae). Key to species groups and a revision of the *denticolle* group. **Iheringia. Série**
652 **Zoologia**, v. 91, p. 151-158, 2001.

653 FORATTINI, O. P. *Culicoides* da região Neotropical (Diptera: Ceratopogonidae). **Arquivos da**
654 **Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 2, p. 161-
655 526, 1957.

656 FORERO, D. The systematics of the Hemiptera (Sistemática de Hemiptera). **Revista**
657 **Colombiana de Entomología**, v. 34, p. 1-21, 2008.

658 FORISTER, M. L.; FELDMAN, C. R. Phylogenetic Cascades and the Origins of Tropical
659 Diversity. **Biotropica**, v. 43, p. 270-278, 2011.

660 Fox, I. A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *Leptoconops* and
661 *Lasiohelea*) with keys to the subgenera and Nearctic species a geographic index, and
662 bibliograpy. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 39, p. 214-284,
663 1955.

664 FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila*
665 species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South **American Journal of**
666 **Biogeography**, v. 40, p. 142-154, 2013.

667 GARCEZ, D. K. Diversidade e estruturação genética no peixe anual *Austrolebias wolterstorffi*
668 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Rio
669 Grande, 2016.

670 GARCEZ, D. K.; BARBOSA, C.; LOUREIRO, M.; VOLCAN, M. V.; LOEBMANN, D.;
671 QUINTELA, F. M.; ROBE, L. J. Phylogeography of the critically endangered neotropical
672 annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and
673 morphometric evidence of a new species complex. **Environmental Biology of Fishes**, v. 101,
674 p. 1503–1515, 2018.

675 GARCÍA-RÍOS, C. I.; PÉREZ-PÉREZ, N. M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; FUENTES, F. A.
676 Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial
677 DNA cytochrome C oxidase I gene. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**. v. 49, p.
678 193-207, 2014.

679 GARRAFFONI, A. R. S.; Araújo, T. Q.; Lourenço, A. P.; Guidi, L.; Balsamo, M. Integrative
680 taxonomy of a new *Redudasys* species (Gastrotricha: Macrodasyida) sheds light on the invasion
681 of fresh water habitats by macrodasyids. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

682 GIAM, X.; SCHEFFERS, B. R.; SODHI, N. S.; WILCOVE, D. S.; CEBALLOS, G.;
683 EHRLICH, P. R. Reservoirs of richness: least disturbed tropical forests are centres of
684 undescribed species diversity. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 279,
685 p. 67–76, 2012.

686 GIANUCA, K. Aspectos socioeconomicos e ambientais da exploração de *Pinus* sp. no
687 município de São José do Norte e análise das alterações na paisagem em áreas adjacentes aos
688 plantios na região do estreito entre os anos 1964 e 2007. Dissertação de Mestrado, Universidade
689 Federal do Rio Grande, 2009.

690 GIBON, C. A. Diversidade genética, estrutura populacional e conservação de *Cavia magna*
691 (Ximenez, 1980) no extremo sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do
692 Rio Grande, 2016.

693 GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à**
694 **Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

695 HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview.
696 **Biodiversity and Conservation**, v. 6:, p. 451-476, 1997.

697 HAFFER, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**. v, 165, p. 131-137, 1969.

698 HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos Aquáticos na Amazônia**
699 **brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Editora do INPA, 2014.

700 HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed,
701 2010.

702 HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological
703 identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological**
704 **Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

705 HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C.M. Identification of
706 birds through DNA barcodes. **PLOS Biology**, v. 2, n. 10, p. 1657-1663, 2004

707 HINSHAW, S. H.; SULLIVAN, B. K. Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer*
708 during reproduction. **Journal of Herpetology**, v. 24, p. 196-197, 1990.

709 HOLZ, M. Do Mar ao Deserto; A Evolução do Rio Grande do Sul no Tempo Geológico. Porto
710 Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

711 HOOGHIEMSTRA, H.; VAN DER HAMMEN, T. Neogene and Quaternary development of
712 the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. **Earth-**
713 **Science Reviews**, v. 44, p. 147–183, 1998.

714 IMBRIE, J.; BOYLE, E. A.; CLEMENS, S. C.; DUFFY, A.; HOWARD, W. R.; KUKLA, G.;
715 KUTZBACH, J.; MARTINSON, D. G.; MCINTYRE, A.; MIX, A. C.; MOLFINO, B.;
716 MORLEY, J. J.; PETERSON, L. C.; PISIAS, N. G.; PRELL, W. L.; RAYMO, M. E.;
717 SHACKLETON, N. J.; TOGGWEILER, J. R. On the Structure and Origin of Major Glaciation
718 Cycles 1. Linear Responses to Milankovitch Forcing. **Paleoceanography**, v. 7, n. 6, p. 701-
719 738, 1992.

720 JOSHI, J.; AGARWAL, I. Integrative Taxonomy in the Indian Subcontinent: Current Progress
721 and Prospects. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 101, n. 2, p. 125–149, 2021.

722 JOWERS, M. J.; COHEN, B. L.; DOWNIE, J. R. The cyprinodont fish Rivulus (Aplocheiloidei:
723 Rivulidae) in Trinidad and Tobago: molecular evidence for marine dispersal, genetic isolation
724 and local differentiation. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.
725 46, n. 1, p. 48-55, 2008.

726 KANDUL, N. P.; LUKHTANOV, A. V.; COLEMAN, J. W. S.; SEKERCIOGLU, C. H.;
727 HAIG, D.; PIERCE, N. E. Phylogeny of *Agrodiaetus* Hubner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae)
728 inferred from mtDNA sequences of COI and COII and nuclear sequences of EF1-alpha:
729 karyotype diversification and species radiation. **Systematic Biology**, v. 53, p. 278-298, 2004.

730 KHALAF. K. T. The speciation of the genus *Culicoides* (Diptera: Heleidae). **Annals of the**
731 **Entomological Society of America**, v. 47, p. 34-51, 1954.

732 LAUCK, D. R. A monograph of the genus *Belostoma* (Hemiptera) Part I. Introduction to *B.*
733 *dentatum* and *subspinosum* groups. **Bulletin of the Chicago Academy of Sciences**, v. 11, p.
734 34-81, 1962.

735 LAUCK, D. R. A monograph of the genus *Belostoma* (Hemiptera) Part. III. *B. triangulum*,
 736 *bergi*, *minar*, *bifoveolatum* and *flumineum* groups. **Bulletin of the Chicago Academy of**
 737 **Sciences**, v. 11, p. 102-154, 1964.

738 LAUCK, D. R. A monograph of the genus *Belostoma* (Hemiptera), Part. II. *B. aurivillianum*,
 739 *stollii*, *testaceopallidum*, *dilatatum*, and *discretum* groups. **Bulletin of the Chicago Academy**
 740 **of Sciences**, v. 11, p. 82-101, 1963.

741 LAUCK, D. R.; MENKE, A. S. The Higher Classification of the Belostomatidae (Hemiptera).
 742 **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, p. 644-657, 1961.

743 LIU, J. X.; GAO, T. X.; WU, S.F.; ZHANG, Y. P. Pleistocene isolation in the Northwestern
 744 Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish *Chelon haematocheilus* (Temnik
 745 & Schlegel, 1845). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 275-288, 2007.

746 LIU, Y.; TAO, H.; YU, Y.; YUE, L.; XIA, W.; Zheng, W.; Ma, H.; Liu, X.; Chen, H. Molecular
 747 differentiation and species composition of genus *Culicoides* biting midges (Diptera:
 748 Ceratopogonidae) in different habitats in southern China. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p.
 749 49-57, 2018.

750 MACHADO, S.; JUNGES DOS SANTOS, J. P.; FONSECA, P. M.; BOLZAN, A. R.; DAVID,
 751 J.; LORETO, E. L. S.; GOTTSCHALK, M. S.; ROBE, L. J. Neotropical mycophagous
 752 drosophilids (Diptera: Drosophilidae): DNA barcoding as a way of overcoming the taxonomic
 753 impediment. **Insect Conservation and Diversity**, v. 10, p. 271-281, 2017a.

754 MACHADO, S.; ROBE, L. J. Co-amplification of Hymenoptera parasitoids? sequences during
 755 DNA Barcoding assessments of mycophagous drosophilids. **Drosophila information service**,
 756 v. 100, p. 56-57, 2017b.

757 MAHNER, M. Systema Cryptoceratorum Phylogenicum (Insecta, Heteroptera). **Zoologica**,
 758 v. 48, p. 1-302, 1993.

759 MAJER, J. D. The conservation and study of invertebrates in remnants of native vegetation. In:
 760 SAUNDERS, D. A.; ARNOLD, G. W.; BURBRIDGE, A. A.; HOPKINS, A. J. M. **Nature**
 761 **Conservation: The Role of Remnants of Native Vegetation**. Surrey Beatty and Sons,
 762 Sydney, 1987.

763 Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Soriguer, R. 2015. Fur or feather? Feeding preferences
 764 of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends in Parasitology*, 31, 16-22.

765 MCCAFFERTY, W. P. **Aquatic Entomology: The Fishermen's and Ecologists' Illustrated**
 766 **Guide to Insects and Their Relatives**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1981.

767 MEIER, R. SHIYANG, K.; GAURAV, V.; NG, P. K. L. DNA barcoding and taxonomy in
 768 Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. **Systematic**
 769 **Biology**, v. 55, p. 715-728, 2006.

770 MELLO, R.; ZVIEJKOVSKI, I. P.; Rabelo, S. G. Material da disciplina de Evolução Biológica,
 771 do 3º período do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas modalidade à distância. In:
 772 **Licenciatura em Ciências Biológicas**, Goiás: Universidade Federal de Goiás (UFG), 2012.

773 MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive
 774 Sampling. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, 2005.

775 MITTERMEIER, R. A. Primate Diversity and the Tropical Forest Case Studies from Brazil and
 776 Madagascar and the Importance of the Megadiversity Countries In: **Biodiversity**. Washington
 777 (DC): National Academies Press (US); 1988.

778 MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G. **Megadiversity: Earth's Biologically**
 779 **Wealthiest Nations**. Mexico: CEMEX, 1997.

780 MOCZEK, A. P. Phenotypic plasticity and diversity in insects. **Philosophical Transactions of**
 781 **the Royal Society B**. v. 365, p. 593–603, 2010.

782 MOREIRA, F. F. F.; Barbosa, J. F.; Ribeiro, J. R. I.; Alecrim, V. P. Checklist and distribution
 783 of semiaquatic and aquatic Heteroptera (Gerromorpha and Nepomorpha) occurring in Brazil.
 784 **Zootaxa**, v. 2958, p. 1-74, 2011.

785 MOREIRA, H. R. História evolutiva de espécies do grupo flavopilosa de *Drosophila*
 786 (DIPTERA, DROSOPHILIDAE): uma abordagem filogenética, filogeográfica e taxonômica.
 787 Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

788 MORITZ, C. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. **Trends in Ecology**
 789 **and Evolution**, v. 9, n. 10, p. 373-5, 1994.

790 NIESER, N. The water bugs (Heteroptera: Nepomorpha) of the Guyana Region. **Uitg.natuurw**
 791 **Studkring Suriname**, v. 16, p. 88-128, 1975.

792 NOONAN, B. P.; GAUCHER, P. Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison
 793 frog *Dendrobates tinctorius*. **Molecular Ecology**. v, 15, p. 4425–4435, 2006.

794 ORTIZ, M. F. Validação do *DNA Barcoding* como identificador de espécies: Um estudo de
 795 ampla amostragem como o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) na
 796 Amazonia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2010.

797 OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FEDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D.;
 798 BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R.; FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome:
 799 the South Brazilian Campos. Perspectives in Plant Ecology. **Evolution and Systematics**. v. 9,
 800 p. 101–116, 2007.

801 PAJUNEN, V. I.; JANSSON, A. Dispersal of the rock pool corixids *Arctocorisa carinata*
 802 (Sahlb.) and *Callicorixa producta* (Reut.) (Heteroptera, Corixidae). **Annales Zoologici**
 803 **Fennici**, v. 6, n. 4, p. 391-427, 1969.

804 PANIZZI, A. R.; GRAZIA, J. G. **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics**. Dordrecht:
 805 Springer, 2015.

806 PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA,
 807 Y. Y.; SITES JR., J. W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii*
 808 complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the
 809 Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**. v, 85, p. 13–26, 2005.

810 PEREIRA, M. H.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. Laboratory rearing of *Belostoma micantulum*
 811 Stål, 1858 (Hemiptera, Belostomatidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 53, p. 603-606,
 812 1991.

813 PINHEIRO, F. P.; ROSA, A. P. A. T.; DA ROSA, J. F. S. T.; DA ISHAK, R.; FREITAS, R.
 814 B.; GOMES, M. L. C.; LEDUC, J. W.; OLIVA, O. F. P. Oropouche Virus. I. A Review of
 815 clinical, Epidemiological., and ecological findings. **American Journal of Tropical Medicine**
 816 **and Hygiene**. v, 30, n. 1, p. 149-160, 1981.

817 POLHEMUS, J. T.; POLHEMUS, D. A. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta)
 818 infreshwater. **Hydrobiologia**. v. 595, p. 379-391, 2008.

819 QUINTELA, F. M.; GONÇALVES, G. L.; BERTUOLD, F; GONZÁLEZE, E. M.; FREITAS,
 820 T. R. O. Genetic diversity of the swamp rat in South America: Population expansion after
 821 transgressive-regressive marine events in the Late Quaternary. **Mammalian Biology**. v, 80, p.
 822 510-517, 2015.

823 RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal
824 drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent
825 continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 225-246, 2006.

826 RIBEIRO, J. R. I.; ALECRIM, V. P. Duas novas espécies de *Belostoma* Latreille, 1807
827 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) do grupo *plebejum* sensu Nieser. 1975. **Acta**
828 **Amazonica**, v. 38, p. 179-188, 2008.

829 Ribeiro, J. R. I.; Estévez, A. L. Small species of *Belostoma* Latreille (Heteroptera,
830 Belostomatidae). III. A revision of *oxyurum* group with a new species from Brazil and
831 description of the male of *B. noualhieri* Montandon. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.
832 53, p. 207–215, 2009.

833 RIBEIRO, J.R.I.; OHBA, S.; PLUOT-SIGWALT, D.; STEFANELLO, F.; BU, W.; MEYIN-
834 A-EBONG, S.E.; GUILBERT, E. Phylogenetic analysis and revision of subfamily
835 classification of Belostomatidae genera (Insecta: Heteroptera: Nepomorpha). **Zoological**
836 **Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 1-41, 2017.

837 RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

838 ROBINS, J.H.; HINGSTON, M.; MATISOO-SMITH, E.; ROSS, H. A. Identifying *Rattus*
839 species using mitochondrial DNA. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 717–729, 2007.

840 ROFF, D. A. The evolution of flightlessness in insects. **Ecological Monographs**, v. 60, p. 389-
841 421, 1990.

842 ROMAN, J.; PALUMBI, S. R. A global invader at home: population structure of the green crab,
843 *Carcinus maenas*, in Europe. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2891–2898, 2004.

844 ROOT, F. M.; HOFFMAN, W. A. The North American species of Culicoides. **American**
845 **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, p. 150-176, 1937.

846 ROVID, A. 2015. Peste Equina Africana. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por
847 RICARDO, M. 2019. Disponível em: [http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets-](http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets-pt.php?lang=pt)
848 [pt.php?lang=pt](http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets-pt.php?lang=pt).

849 RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology &**
850 **Evolution**, v. 26, n. 10, p. 508-513, 2011.

851 RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in
852 the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2722-2729, 2008.

853 SCHUH, R. T.; SLATER, J. A. **True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)**. New
854 York: Cornell University Press, 1995.

855 SCUDDER, G. G. E. In Foottit, R. G. **Insect Biodiversity: Science and Society**. Nova Jersey:
856 Blackwell Publishing Ltd, 2009.

857 SILVA et al., 2020

858 SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA
859 barcoding overestimates the number of species when nuclear mito- chondrial pseudogenes are
860 coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13486–
861 13491, 2008.

862 SUERTEGARAY, D.M.A. **Deserto Grande do Sul: Controvérsia**. Porto Alegre: Editora da
863 Universidade/UFRGS, 1998.

864 SUERTEGARAY, D.M.A.; SILVA, L.A.P. Tchêl Pampa:histórias da natureza gaúcha. In
865 PILLAR, V.P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. **Campos Sulinos-
866 conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente,
867 2009.

868 TAY, W. T.; ELFEKIH, S.; COURT, L. N.; GORDON, K. H. J.; DELATTE, H.; DE BARRO,
869 P. J. The trouble withMEAM2: implications of pseudogenes on species delimitation in the
870 globally invasive Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species complex. **Genome
871 Biology and Evolution**, v. 9, n. 10, p. 2732–2738, 2017.

872 TOMAZELLI, L. J.; VILLWOCK, J. A. Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o
873 Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. **Gravel**, n. 3, p. 109-115, 2005.

874 USINGER, R. L. **Aquatic Insects of California**. Berkeley and Los Angeles: University of
875 California Press, 1968.

876 VEPSÄLÄINEN, K. The distribution and habitats of *Gerris* Fabr. Species (Heteroptera,
877 Gerridae) in Filand. **Annales Zoologici Fennici**, v. 10, p. 419-444, 1973.

878 VILLWOCK, J. A.; TOMAZELLI, L. J. Planície Costeira do Rio Grande do Sul: gênese e
879 paisagem atual. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A; MOURA, L. A. **Biodiversidade. Regiões
880 da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul**.
881 Brasil: Ministério do Meio Ambiente/SBF, 2007.

882 VYSKOČILOVÁ, S.; TAY, W. T.; BRUNSCHOT, S.; SEAL, S.; COLVIN, J. An integrative
 883 approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* white-fly species complex.
 884 **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

885 WARD, R. D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D. DNA barcoding
 886 Australia's fish species. **Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological**
 887 **Science**, v. 360, p. 1847–1185, 2005.

888 WEIR, J. T. Diver timing and patterns of species accumulation in lowland and highland
 889 neotropical. **Evolution**, v. 60, n. 4, p. 842–855, 2006.

890 WILLIAMS, D. D.; FELTMATE, B. W. **Aquatic Insects**. Oxford: C.A.B. International,
 891 Wallingford, 1992.

892 WIRTH, W.W. The Heleidae of California. **University of California publications in**
 893 **entomology**, v. 9, p. 95-266, 1952a.

894 YASSIN, A.; MARKOW, T. A.; NARECHANIA, A.; O'GARDY, P. M.; DESALLE, R. The
 895 genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species
 896 identification using DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, p. 509–
 897 517, 2010.

898 YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M.; COURTNEY, G. W.; MEYER, R.; LAMBKIN, C.;
 899 PAPE, T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects.
 900 **Zootaxa**, v. 1668, p. 565–590, 2007.

901 ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. Trends, rhythms, and
 902 aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, v. 292, p. 686–693, 2001.

903 ZERA, A. J.; DENNO, R. F. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects.
 904 **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 207-230, 1997.

CAPÍTULO 1

Disentangling the taxonomy of *Belostoma* Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA Barcoding approaches

Artigo publicado na revista Austral Entomology. Fator de impacto: 1.552; Qualis na Biodiversidade: B1

Normas de formatação:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/20521758/homepage/forauthors.html>



Disentangling the taxonomy of *Belostoma* Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA Barcoding approaches

Thaísa B Gauterio¹, José Ricardo I Ribeiro², Lizandra J Robe^{1,3*}, Augusto Ferrari^{4,5}

¹Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Av. Itália, km 08, Brazil.

²Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Avenida Antônio Trilha, 1847, Brazil,

³Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Avenida Roraima, 1000, Brazil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Laboratório de Entomologia, Sistemática e Biogeografia - LESB

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Brazil.

* lizbiogen@gmail.com

Running Title

DNA Barcoding of *Belostoma*.

Abstract

Belostoma is the most diverse genus of Belostomatidae, comprising 74 species. The small *Belostoma* species are challenging to identify mainly due to the presence of cryptic species. As DNA Barcoding has been a crucial tool to solve the taxonomic impediment associated with many taxa, we compared species delimitations obtained by morphological and molecular approaches, in order to help to disentangle the taxonomy of *Belostoma*. We sampled 192 specimens of *Belostoma* across the Rio Grande do Sul Coastal Plain. Specimens were first identified with the use of morphological markers and then characterized for two mitochondrial markers: COI and the 16S rRNA genes, generating 181 and 164 sequences, respectively. These were complemented with *Belostoma* sequences downloaded from NCBI/BOLD (101 for COI, 13 for 16S). Thus, matrixes including 282, 177, and 299 sequences for COI, 16S and the concatenated dataset, respectively, were analysed through phylogenetic, phylogeographic and distance approaches. The initial morphological evaluation allowed the identification of 14 male genitalia morphotypes, whose sequences were added to a preliminar matrix containing GenBank/NCBI sequences of five other described species, allowing us to recover ten clades in the molecular analyses. Patterns of reciprocal monophyly were confirmed for only six of the studied species: *Belostoma angustum*, *B. cummingsi*, *B. dentatum*, *B. noualhieri*, *B. orbiculatum*, and *B. ribeiroi*. *Belostoma candidulum*, *B. horvathi* and *B. sanctulum* appeared intermingled in a single clade. The grouping of these with the other five distinct (male genital) morphotypes reveals a clade with high levels of morphological polymorphism or phenotypic plasticity.

Keywords: COI; 16SrRNA; Insecta; molecular taxonomy; phenotypic plasticity.

INTRODUCTION

The diversity of life on Earth is a basic but still very controversial issue. Currently, taxonomists suggest that the total number of species on the planet ranges from three to 100 million (May 2010). The percentage of undescribed species in terrestrial and marine habitats is estimated to range from 86 and 91%, respectively (Mora et al. 2011). This knowledge gap exists for several reasons, but is specially related to sampling limitations, to shortages related to the deficit of qualified taxonomists for the identification and description of species (i.e. the “taxonomic impediment”), and to a lack of knowledge of the geographical distribution of many species.

Lack of distribution data becomes more serious when considering cryptic or undescribed species. When considered in the context of ongoing anthropic actions (e.g. habitat loss and degradation), such a deficit in knowledge may mask “crypto extinctions”. These occur when species go extinct before they are discovered or described (Giam et al. 2013). This problem is exacerbated for small-bodied and diverse groups such as insects. In these groups, identification is often difficult, not only due to the vast diversity of undescribed species, but also due to the presence of cryptic species, the difficulties in assigning diagnostic characters to specimens belonging to different sexes or life stages, and to the intraspecific variability exhibited by individuals of the same sex at the same stage of the life cycle (Moczek 2010).

Species of Belostomatidae Leach 1807 are popularly known in Brazil as water bugs. They are distributed worldwide, except for the Arctic regions and parts of the Palearctic, including much of Europe and northeast Asia (Lauck & Menke 1961). They are effective “biting” predators responsible for biological control in aquatic environments (Ribeiro 1999), where they consume insects, fish, frogs and even turtles (Consoli et al. 1989; Pereira et al. 1991; Hinshaw & Sullivan 1990; Monte 1945; Schuh & Slater 1995). Besides their ecological

importance, species of Belostomatidae sometimes represent an economic threat as pests in fish farms (Dimmock 1887; Merritt & Cummins 1996).

Most Belostomatidae phylogenies inferred to date have been performed using morphological characters (Mahner 1993), except for the study by Ribeiro et al. (2018), which used a multigene analysis in association with morphological characters. Although this study presented some results that are widely congruent with those provided by Martínez-Delclòs et al. (1995), evolutionary relationships between and within Belostomatidae genera are still a matter of debate. This is the case, for example, for the phylogenetic positioning of *Belostoma* Latreille (1807): this genus was included in the Belostomatini tribe along with *Abedus* Stål (1862) in the phylogeny of Mahner (1993), since both genera share two-segmented tarsi containing only one visible claw. Ribeiro et al. (2018) also included *Weberiella rhomboides* (Menke, 1965) in the same tribe, although this species does not share any morphological synapomorphy with *Belostoma* or *Abedus* (Mahner, 1993). The relationships between *Belostoma* species were never explored, and thus provide no evidence of phylogenetic relationships within the genus.

Belostoma is the most specious genus in Belostomatidae, comprising 74 species, 46 of which occur in Brazil (Moreira et al. 2011). In general, the genus comprises organisms that are difficult to identify morphologically due to the lack of identification keys covering both sexes. Moreover, as the phallus is the taxonomic structure generally used for the identification of morphologically similar species, there is an inherent difficulty in identifying females and nymphs. These factors, together with intraspecific variability, make the genus a target of major taxonomic incongruities. *Belostoma* is traditionally subdivided into 16 species groups based on male genitalia patterns, and these are grouped according to body size categories (Lauck 1962): large species (26.0 to 50.0 mm long), midsize species (15.5 to 26.0 mm in length) and small species (9.5 to 22.0 in length). Among these, the *B. testaceopallidum sensu*

Lauck (1963) (3 spp.) and *B. dentatum sensu* Ribeiro et al. (2017) groups (17 spp.) are considered large-sized; the *B. bifoveolatum sensu* Lauck (1964) (3 spp.) and *B. flumineum sensu* Lauck (1964) groups (4 spp.) encompass medium-sized species; and the *B. oxyurum sensu* Ribeiro & Estévez (2009) (7 spp.), *B. plebejum sensu* Ribeiro & Alecrim (2008) (7 spp.) and *B. denticolle sensu* Estévez & Polhemus (2001) (4 spp.) groups are small-sized. However, the reciprocal monophyly of these groups, as well as the effectiveness of body size as a diagnostic feature have never been tested.

Given the high diversity and morphological complexity of *Belostoma*, molecular identification tools are likely to provide useful information for resolving taxonomic issues associated with the group. DNA barcoding can make a significant contribution to this task, since it usually permits the identification of described and undescribed species through a small fragment of DNA that ultimately functions as a “barcode” (Hebert et al. 2003). The main assumption for the applicability of this technique is the existence of a Barcoding Gap, where the intraspecific distances (genetic distances between individuals of the same species) are always smaller than the interspecific distances (genetic distances between individuals of different species) (Hebert et al. 2003; Hebert et al. 2004). For this assumption to be fulfilled, it is important that individual species are reciprocally monophyletic.

The aim of this study was to compare species delimitations obtained by morphological and molecular approaches in order to help disentangling the taxonomy of *Belostoma* while addressing the taxonomic impediment that hampers further studies with the group. We aimed to test if DNA barcoding constitutes an effective approach to resolving the taxonomy of *Belostoma*, especially concerning small-bodied species, such as those belonging to the *Belostoma oxyurum* group.

MATERIALS AND METHODS

Collections and identifications

The new specimens used in this study were collected at 14 points distributed in different cities of the Southernmost Brazilian state of Rio Grande do Sul (Supplementary Material - Table S1) (Figure 1), using sieves and “D” mesh to sort insects among the aquatic vegetation.

Individuals collected were stored in 100% ethanol and maintained in the laboratory at -20°C.

Whenever possible, identification of nymphs and females was performed through the evaluation of external characters. Male specimens were further identified with the aid of internal male genitalia patterns using identification keys of Estévez & Polhemus (2001), Lauck (1962, 1964), Lauck & Menke (1961), Nieser (1975), Ribeiro & Alecrim (2008), Ribeiro & Estévez (2009), and Ribeiro et al. (2017).

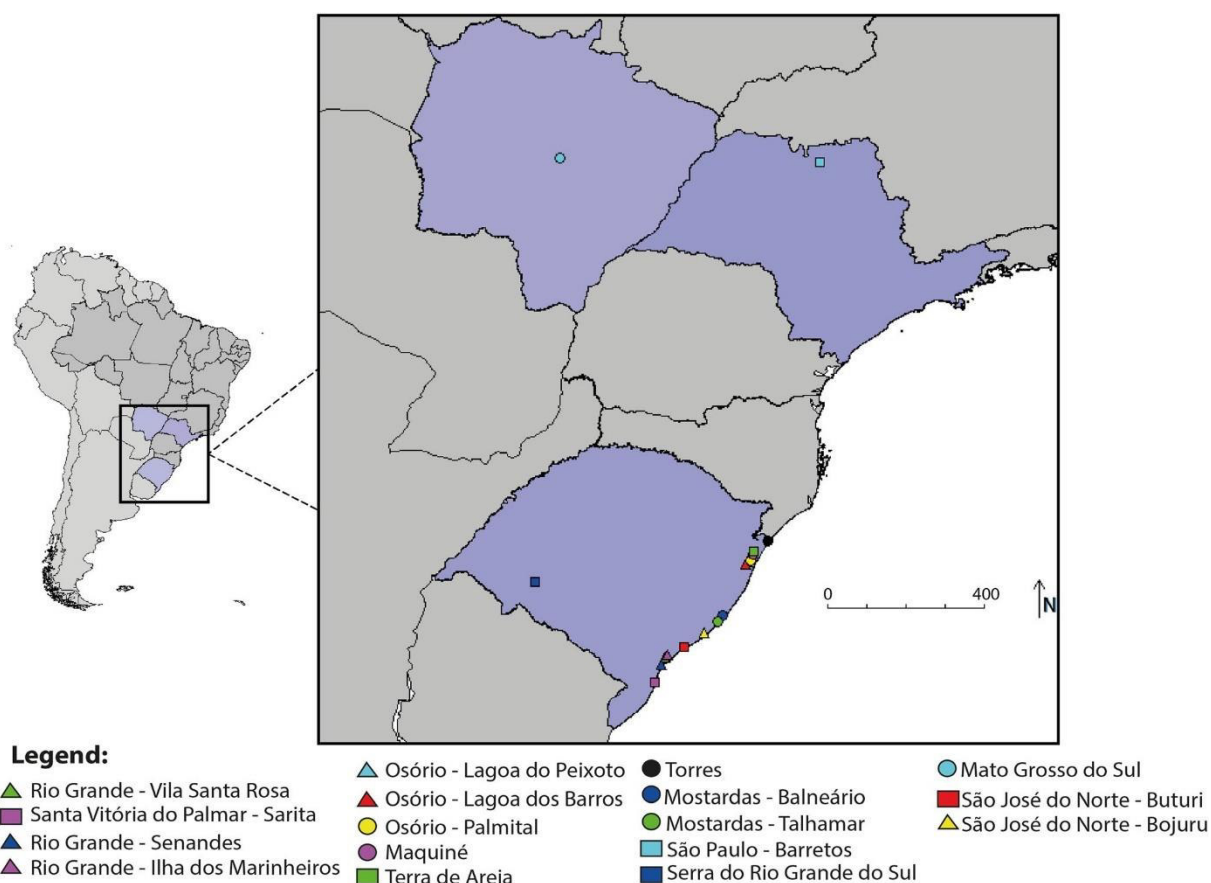


Figure 1. Map of South America highlighting the Brazilian states where the collections were made (São Paulo, Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul). Two sampling points outside South America, reported for sequences downloaded from GenBank or BOLD (located in Texas and Kansas, USA), have not been shown in the map. Each symbol refers to a single collection point.

DNA Manipulation

DNA extraction was performed using Nucleo SpinTissue XS kit (MACHEREY-NAGEL). The mitochondrial genes were amplified using primers TYJ1460: 5' TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC3' (Simon et al. 1994) and HCO2198: 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3' (Folmer et al. 1994) for Cytochrome C oxidase subunit I (COI), and LRK13417: 5' CGCCTGTTTAACAAAAACAT 3' (Simon et al. 1994) and LRJ12961: 5' TTTAATCCAACATCGAGG 3' (Cognato & Vogler, 2001) for 16SrRNA. In each 20 µl reaction, 50-100 ng DNA was added to a mix containing 1 × buffer, 1µM of each primer, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 0.5 U Taq DNA polymerase. COI amplification was performed by means of an initial stage of denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 55–57 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, and by a final extension cycle at 72 °C for 7 min. The same conditions were employed for 16S, except for the annealing temperature and time, which consisted of 52.5 °C for 1 min. and 15 s. The amplicons were purified with a solution containing 7.5M ammonium acetate (C₂H₇NO₂) and then directly sequenced by MACROGEN (Seoul, South Korea) on a 23 ABI 3730XLs automated sequencer using the same PCR primers.

Phylogenetic and coalescence analyses

Initially, the sequences contained in the electropherograms had their identity confirmed by BLASTN (NCBI, 2019). All electropherograms were then inspected and assembled in Gap4 from the Staden package (Staden 1996). Additional sequences of COI and 16S previously characterized for other *Belostoma* specimens were downloaded from GenBank (NCBI Resource Coordinators 2018) and BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) (Supplementary

Material - Table S2). Sequences of *Diplonychus rusticus* Fabricius, 1871 and *Appasus major* Esaki, 1934 were used as outgroups in the phylogenetic analyses.

Alignments were performed using ClustalW, as presented in Mega 7.0 (Tamura et al. 2013). Phylogenetic analyses were conducted individually and simultaneously using Bayesian Analysis in MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). The individual and simultaneous analyses were performed with the use of the best partitioning scheme, which was selected together with the best evolutionary models under the Bayesian Information Criterion, as determined by PartitionFinder (Lanfear et al. 2017), under a greedy search. For this task, COI was initially partitioned into codon positions, and 16S in stems and loops, as obtained by LocARNA (<https://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp>) and RNAEval (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAeval.cgi>). The best model for first, second and third COI codon positions was F81+I, GTR+G and SYM+I+G, respectively. For 16S stems + loops, the best model was HKY+I+G. For the concatenated dataset, the best models for first, second and third COI codon positions and 16S stems + loops were F81+I, GTR+G, SYM+I+G and HKY+I+G, respectively. The relationships between haplotypes were also inferred through the construction of haplotype networks by the median-joining algorithm in Network 5.0.1.1 software (Bandelt et al. 1999).

In addition, a Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) coalescence analysis (Pons et al. 2006; Fontaneto et al. 2007; Fujisawa & Barraclough 2013) was performed only for the concatenated matrix with the rnc1 (Michonneau et al. 2020), ape (Paradis et al. 2004), paran (Dinno 2018) and splits (Ezard et al. 2019) packages in R4.0.2 (R Development Core Team, 2020). For this analysis, an ultrametric tree was initially generated in Beast 1.7.4 (Drummond et al. 2012) under a strict molecular clock, with the nucleotide substitution models mentioned above. Unlinked substitution and clock models were set in order to accommodate different patterns and rates of molecular evolution, although both genes were

assumed to share the same tree. MCMC searches involved 40,000,000 generations, sampling every 5,000, with a burn-in of 10%. The rnc1 package was used to import the tree into R4.0.2, and the three other packages were employed to run the GMYC analyses on this tree.

Distance analyses

An Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) analysis was performed in ABGD Web (ABGD Web 2019) using the Kimura 2-parameters model (K2P) and a prior of 0.04. This analysis tests different taxon subdivisions without any a priori designation of species or lineages. In addition, classical distance analyses were also employed using the subdivisions suggested by the bulk of molecular results. In this case, the intra and inter-clade distances were calculated in Mega 7.0, using the Kimura-2-parameters model.

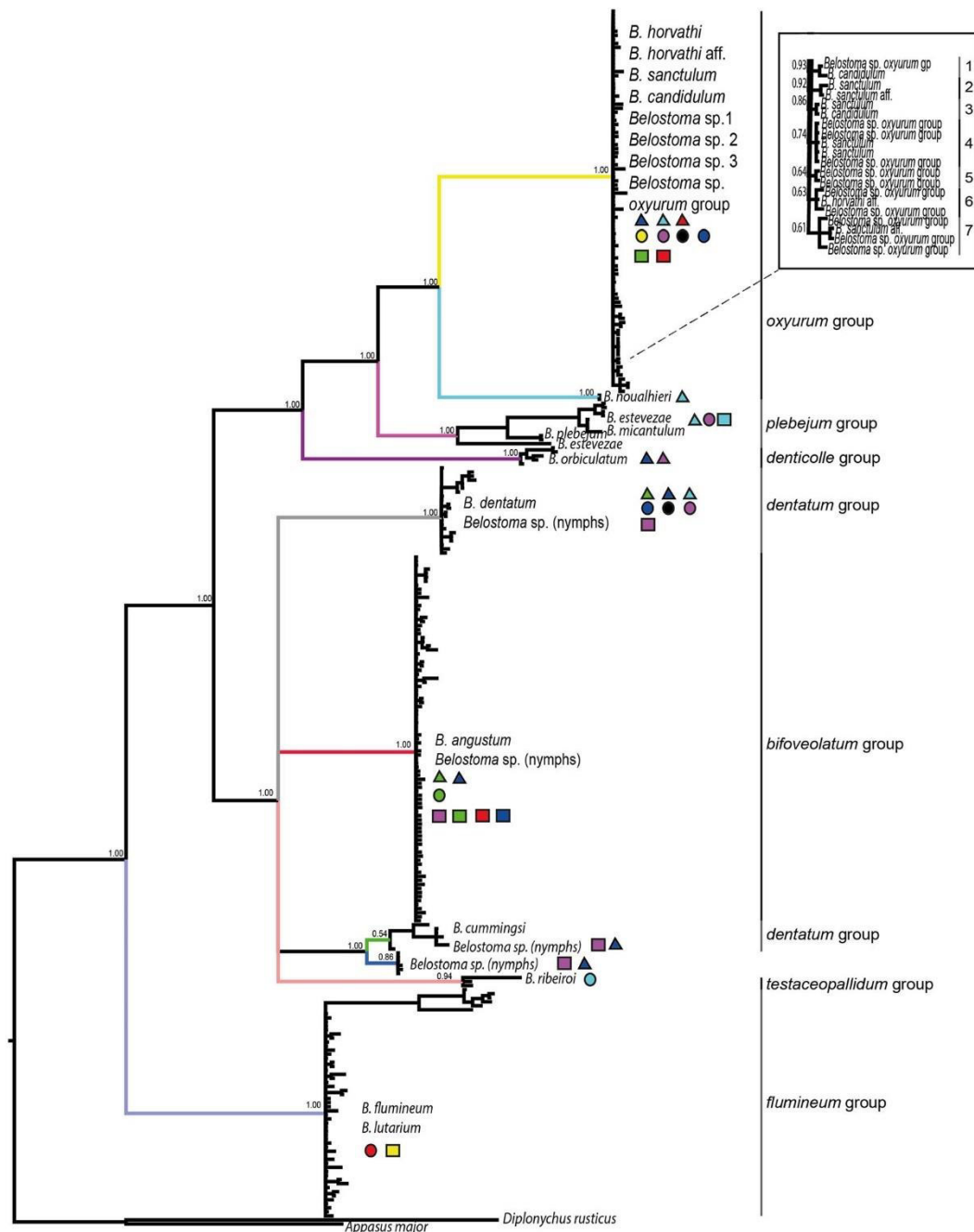
RESULTS

We sampled 56 males, 73 females and 63 nymphs, totalling 192 specimens of *Belostoma* (Supplementary Material - Table 1S). The genetic characterization of these specimens led to 181 and 164 sequences of COI and 16S, which were complemented by 101 and 13 sequences, respectively, downloaded from BOLD and GenBank (NCBI) (Supplementary Material - Table 2S). Thus, the analyses were conducted with a total of 282, 177, and 299 sequences for COI, 16SrRNA and the concatenated dataset, respectively.

The identity of nymphs was only attributed for *B. angustum* Lauck, 1964, due to the presence of laterotergite hairiness that reaches the genital operculum, and females were only identified for *B. angustum*, *B. dentatum* (Mayr, 1863), *B. estevezae* Ribeiro & Alecrim, 2008, *B. horvathi* Montandon, 1903, *B. orbiculatum* Estévez & Polhemus, 2001 and *B. sanctulum* Montandon, 1903, mainly by the patterns exhibited by the prosternal keel. For others, identification was not possible due to the absence of identification keys involving internal morphological characteristics for females and the absence of diagnostic morphological

characteristics in nymphs. Regarding the collected males, it was possible to identify the presence of 14 different morphotypes: nine belonging to previously described species [*B. angustum* (15 males), *B. candidulum* Montandon, 1903 (4 males), *B. cummingsi* De Carlo, 1935 (1 male), *B. dentatum* (2 males), *B. estevezae* (1 male), *B. horvathi* (1 male), *B. noualhieri* Montandon, 1903 (2 males), *B. orbiculatum* (2 males), *B. sanctulum* (eight males)], three with internal genital morphology not yet described [*Belostoma* sp. 1 (3 males), *Belostoma* sp. 2 (3 males) and *Belostoma* sp. 3 (2 males)], plus two specimens with approximate internal genital morphology of *B. horvathi* [*(B. horvathi* affinis - 6 males) and *B. sanctulum* (*B. sanctulum* affinis - 2 males)]. An additional female and nymph morphotype were provisionally identified as *Belostoma* sp. BOLD and GenBank sequences further expanded the number of sequences for *B. angustum* and *B. cummingsi*, and also added *B. micantulum* (Stål, 1860), *B. plebejum* (Stål, 1860), *B. ribeiroi* De Carlo 1933, *B. lutarium* (Stål 1855) and *B. flumineum* Say, 1832 to the evaluations.

According to the phylogenetic analysis performed with the nucleotide sequences of the concatenated data (Figure 2) or the COI gene (Supplementary Material - Figure S1), ten clades were recovered. Analysis of 16S retrieved nine clades (Supplementary Material - Figure S2), showing the grouping between lineages Green and Blue recovered with COI and the concatenated data. This difference can be explained by the fact that 16S is generally more conserved than COI (Mueller 2006) so that the former does not seem to have accumulated enough substitutions to lead to the separation of clades that have diverged more recently.



Legend:

▲ Rio Grande - Vila Santa Rosa
■ Santa Vitória do Palmar - Sarita
▲ Rio Grande - Senandes
▲ Rio Grande - Ilha dos Marinheiros

▲ Osório - Lagoa do Peixoto
▲ Osório - Lagoa dos Barros
● Osório - Palmital
● Maquiné
■ Terra de Areia
● Torres
● Mostardas - Balneário
● Mostardas - Talhamar
■ São Paulo - Barretos
■ Serra do Rio Grande do Sul

● Mato Grosso do Sul
■ Texas - USA
● Kansas - USA
■ São José do Norte - Buturi
▲ São José do Norte - Bojuru

Scale:

0.02

Figure 2. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of the concatenated dataset including 650 bp of COI and 302 bp of 16S. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the posterior probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

We will assume here the results of the concatenated analysis as the main phylogenetic hypothesis of this study (Figure 2), whose clades are thus constituted:

- Yellow clade: According to the tree generated by the individual and concatenated datasets (Figure 2 and Supplementary Material - Figures S1 and S2), the Yellow clade (PP = 1.00) encompassed the most substantial diversity of species, among which are three morphotypes from species already described [*B. candidulum*, *B. horvathi* and *B. sanctulum*] and five male morphotypes not already described in the current literature. These include two morphotypes with male internal morphology similar to species previously described [one similar to *B. sanctulum* (*B. sanctulum* aff.) and another to *B. horvathi* (*B. horvathi* aff.)], and three male morphotypes that showed differences in the characters used for identification at the specific level in relation to the current and standard literature [*Belostoma* sp.1, *Belostoma* sp. 2, and *Belostoma* sp. 3]. Despite the low support, this grouping is subdivided into seven subclades (PP = 0.93, 0.92, 0.86, 0.74, 0.64, 0.63, 0.61, respectively) (Figure 2). Subclade 3 (PP = 0.86) stands out for grouping individuals of different species: a male of *B. candidulum* identified through internal morphology and a female of *B. sanctulum* through external characters. One female from each of subclades 3, 4, 5, and 6 of the Yellow clade was examined for internal morphological characters (Figures S3), revealing subtle differences in their morphology. The representative of subclade 3 has a short spermatheca with the ampulla-like part (see *Diplonychus* in Ribeiro et al. 2018) inflated (Figure S3a). Unlike the representative of subclade 3, the females of subclades 4, 5, and 6 bear longer spermathecae (Figures S3b-d) and less evident inflated ampulla-like parts. However, the representative of subclade 6 shows spermatheca and ampulla-like parts with subtly different morphology. Accordingly, the ampulla-like region is less inflated and evident, and not distinctly separated from the spermatheca (Figure S3d). Because only one individual was examined from each subclade, it is possible that the variation we found is present across members of the same subclade. The

other subclades were represented by at least one male, identified at the species level, either to species already described or not. The Yellow Clade also included, in the form of a polytomy, individuals who showed morphotypes with external genitalia different from those known and documented in the current literature: “*Belostoma* sp. 1” characterized mainly by the internal morphology that shows thick dorsal arms but did not cover the ventral diverticulum (Figure S4a), “*Belostoma* sp. 2” that demonstrated similarities in external morphology with species already described, but different male genitalia, with dorsal arms parallel, narrow and longer in relation to the ventral diverticulum than the other species in the group (Figure S4b), and *Belostoma* sp. 3, that presents parallel dorsal arms which tend to diverge in the apex (Figure S4c). In addition, two other morphotypes were suggested: 1) a male characterized by genitalia considered to be morphologically similar to *B. sanctulum* (*B. sanctulum* aff.) (Figure S4d) and 2) a male morphologically similar to *B. horvathi* (*B. horvathi* aff.), showing an incompletely truncated prosternal carina (Figure S5a) and distinctive male genitalia (Figure S5b). More individuals need to be examined to confirm if this pattern remains consistent. Given the very low genetic distances between subclades or morphotypes, it is more likely that these apparent differences represent intraspecific variation, possibly due to phenotypic plasticity, or genetic polymorphisms.

- Cyan (PP=1.00), Purple (PP=1.00), Gray (PP=1.00), Red (1.00), Green (0.54) and Light Pink (PP=0.94) (Figure 2) Clades were represented by *B. noualhieri*, *B. orbiculatum*, *B. dentatum*, *B. angustum*, *B. cummingsi* and *B. ribeiroi*, respectively, and by females and nymphs not specifically identified, but which probably belong to the respective species. Even so, two species appeared to be paraphyletic: *B. estevezae* (in relation to *B. micantulum* and *B. plebejum* – Pink Clade - PP = 1.00) and *B. flumineum* (in relation to *B. lutarium* – Light Purple Clade - PP = 1.00). Lastly, the Blue Clade (PP = 0.86) comprises nymphs probably

belonging to some species not sampled as adults in our dataset or not yet described. Marker 16S grouped this with the Green Clade.

At deeper phylogenetic scales, this study contributed to the establishment of a hypothesis for the phylogenetic relationships between the evaluated species, even if it reflects just a gene tree (and not necessarily the species tree). According to this hypothesis, the sampled species are subdivided into two large clades: one containing specimens of the *B. flumineum* group [light purple clade (*B. flumineum* and *B. lutarium*)] (PP = 1.00) and another (PP = 1.00) that can be subdivided in two large subclades: one containing specimens of the *oxyurum* group [Yellow clade (*B. horvathi*, *B. sanctulum*, *B. candidulum*, plus the five other morphotypes) + Cyan clade (*B. noualhieri*)], clustered with the *B. plebejum* [Pink clade (*B. estevezae*, *B. micantulum* and *B. plebejum*)] and *B. denticolle* groups [Purple clade (*B. orbiculatum*)] (PP = 1.00), and another one grouping the *B. bifoveolatum* [Red clade (*B. angustum*)], *B. dentatum* [Green (*B. cummingsi*) and Gray (*B. dentatum*) clades], *B. testaceopallidum* groups [Light Pink clade (*B. ribeiroi*)] (PP = 1.00).

GMYC coalescence analysis for the concatenated datasets suggested 14 groups: each of the Yellow, Cyan, Purple, Grey, Red, Green, Blue, and Light Pink clade formed a single cluster. The Pink Clade was subdivided into three clusters: 1) *B. estevezae* + *B. micantulum*; 2) *B. plebejum* and 3) the diverging individual of *B. estevezae* (individual 2075). The Light Purple Clade also was subdivided into three groups: 1) most individuals of *B. flumineum* + one individual of *B. lutarium*; 2) *B. flumineum* and 3) one individual of *B. lutarium* (sequence number CNCHA751_11).

Distance analysis

The ABGD distance analysis retrieved 13 groups for COI. Yellow, Cyan, Purple, Red, Gray and Light pink represented a single group each. The Pink and Light purple clades were

divided into three groups each: (*B. estevezae* + *B. micantulum*), (*B. plebejum*) and (*B. estevezae* - individual 2075), for the first, and (*B. flumineum*, forming a subclade); (*B. flumineum*, forming a polytomy) and (*B. lutarium* - individual CNCHA751_11), for the second. The Blue and Green clades formed a single cluster. The GMYC analysis of the gene presented a similar result, but with one more group (totalling 14 groups), since it considered the Green and Blue clades in single groups.

The 16S ABGD distance analysis retrieved 6 groups: one for each of the Yellow, Cyan, Pink, Purple and Light purple clades and the Red, Gray, Green, Blue and Light pink clades were in a single group each. The GMYC analysis recovered 10 groups: Yellow, Cyan, Pink, Purple, Gray, Green, Light pink and Light purple clades. The Red clade was divided into two distinct groups.

Given the general congruence between these results and those obtained by phylogenetic and coalescence analyses, the ten-group subdivision was used as a conservative choice in the other distance analyses, in order to compare how the different markers support the large subdivision proposed in this study. That is, although 16S did not recover the ten groups, the analysis of Green and Blue clades separately shows how different the two clades are.

Regarding the analysis of K2P distances, intra-clade distances for COI ranged from 0% to 8.62% and 9.92% (as seen for Pink and Light Purple clades). For all other clades, the values of the intra-clade distances did not exceed 2.03% (Table 1). Regarding inter-clade comparisons, minimum values of 3.29% were obtained in comparisons between Green and Blue clades (Table 1). Despite the high values of intraspecific diversity found for the Pink and Light Purple clades, there is a barcoding gap for the COI gene even regarding these clades. For 16S, the intra-clade distances ranged from 0% to 3.13 (for Red clade) and 3.24% (for Pink clade), while the inter-clade distances ranged from 0.0012% (in comparisons involving

specimens of Green and Blue clades) to 8.0% (Table 2). This demonstrates that for 16S, a barcoding gap could not be found for the Red, Green, and Blue clades.

DISCUSSION

DNA Barcoding is an important tool for identifying and describing new species in the most diverse animal groups, from insects (Machado et al. 2017), spiders (Barrett & Hebert 2005), fish (Ward et al. 2005), birds (Hebert et al. 2004) and mammals (Robins et al. 2007). The analyses performed here for *Belostoma* confirms previous assumptions that DNA Barcoding may be a promising identification tool also for this genus (Ribeiro & Estévez 2009). In this sense, this study suggests, first of all, the redefinition of some species of the *B. oxyurum* group that encompass the Yellow clade (*B. candidulum*, *B. horvathi* and *B. sanctulum*) and the revision of diagnostic characteristics related to the internal morphology of males of these species. In fact, our molecular data suggest that these species may comprise a single species with high levels of morphological polymorphism or phenotypic plasticity, since it covers at least the following nine different male genital forms or morphotypes that can be generally attributed to the *oxyurum* group: *B. horvathi*, *B. sanctulum* and *B. candidulum*, *B. horvathi* aff., *B. sanctulum* aff., *Belostoma* sp., *Belostoma* sp.1, *Belostoma* sp. 2 and *Belostoma* sp. 3. This variability calls attention not only to the diversity and amplitude of the clade, but also to the fact that there is not any apparent geographic subdivision among morphotypes. In this sense, for example, six of the morphotypes encompassing the Yellow clade (*B. horvathi*, *B. sanctulum*, *B. candidulum*, *B. sanctulum* aff., *Belostoma* sp. and *Belostoma* sp.1) were found in sympatry in a single sampling point located on the municipality of Osório – RS.

Belostoma taxonomy

Six of the fourteen described species studied here were reciprocally monophyletic, namely *B. angustum*, *B. cummingsi*, *B. dentatum*, *B. noualhieri*, *B. orbiculatum* and *B. ribeiroi*. Of these,

four are medium to large body sized species, showing that DNA Barcoding proved here to be very useful in separating the medium and large body sized *Belostoma* clades. For the other eight described species, phylogenetic relationships based on DNA analysis did not match species designations, indicating potential issues with morphological taxonomy. In fact, the scenario related to *B. candidulum*, *B. horvathi* and *B. sanctulum* (Figure 2) is quite complex, as these species turned out to be paraphyletic with respect to each other. Based on DNA evidence, these taxa are likely a single species, which displays morphological variability in their male genitalia. More sophisticated methods that estimate gene flow between taxa are required to test this hypothesis. In addition, the clade that contains them also grouped five other morphotypes whose male genitalia slightly differ from those of the other known *Belostoma* species. Many of these morphotypes were simultaneously collected at our collection points. They have typical “*oxyurum*-like” morphology, that is, the anterior interocular width is about 1.5 times the width of one eye, pilosity covering more than half of the connexivum, and the diverticulum of the phallus is flattened, circular and enlarged in ventral view as well as not curved in lateral view (Ribeiro 2007; Ribeiro & Estévez 2009).

According to Ribeiro (2007) and Ribeiro & Estévez (2009), to identify the *B. oxyurum* group species, it is necessary to extract the male genitalia and observe the shape, thickness, and position of the dorsal arms in relation to the diverticulum. As the identifications provided by the evaluation of these characters in adult males did not match the phylogenetic relationships, and as sequences recovered for different morphotypes of the *B. oxyurum* group were extremely similar (with a maximum value of 1.36%), our findings seem to indicate that the differences referred to as “important diagnostic differences” in the traditional identification keys of the group may actually be intraspecific variation reflecting polymorphic or plastic states. Possibly, all this variation might be part of a complex system of slight differences in the positioning of the dorsal arms of males of *B. candidulum*, since it is the only

species of the Yellow clade that was described based on a female holotype from a single locality of the Brazilian Rio Grande do Sul State (Ribeiro & Estévez 2009). Despite that, we also found some variation throughout spermatheca samples of females of the *B. oxyurum* group related to the Yellow clade (Figures S3a, b, c, d). Although almost the entire *B. oxyurum* group may refer to a single species with high levels of polymorphisms or phenotypic plasticity, the use of nuclear markers (e.g. SNPs) that allow testing gene flow between taxa is necessary to confirm this pattern. Once confirmed, the species within this group should be comprehensively revised in order to improve our understanding of their taxonomy.

Two other species also appeared to be paraphyletic: *B. estevezae* in relation to *B. micantulum* and *B. plebejum*, three species of the *B. plebejum* group that constituted the Pink clade; and *B. flumineum* in relation to *B. lutarium*, two species of the *flumineum* group that constituted the Grey clade (Figure 2). Regarding the *B. plebejum* group, we suggest that the morphological identification of *B. micantulum* might be uncertain due to much ambiguity present in the interpretation of some identification keys. In fact, much variation has also been found among species of the *B. plebejum* group regarding male genital morphology, with the lateral margins of the diverticulum not thickened, i.e., *B. plebejum* group *sensu* Lauck (1962) (JRIR, personal observation). Likewise, it is worth mentioning that the name *B. micantulum* has been applied to a complex of some similar species (Ribeiro 2007), raising doubts related to imperfect taxonomy. The problem observed herein with one specimen of *B. estevezae* also reflects problems related to morphological identification. The genetic distances between the sequence of this individual and the others of *B. estevezae* are clearly out of the expected intraspecific ranges. As the type specimen of *B. estevezae* was previously evaluated by one of the authors (JRIR), we are inclined to believe that this is a case of cryptic diversity revealed for the *B. plebejum* group. Species without apparently remarkable diagnostic features in male

genitalia (e.g., *B. plebejum*, *B. micantulum*, *B. estevezae*, and *B. nessimiani*; see Estévez & Polhemus 2007 and Ribeiro & Alecrim 2008) seem to be especially prone to this.

Lastly, the paraphyletic status of *B. flumineum* in relation to *Belostoma lutarium* Stål (1855) might also be related to misidentification, although this is difficult to assess because these sequences were downloaded from GenBank, and we did not have access to the specimens. Moreover, both species do not occur in our sampling area and originate from USA and Canada, which did not allow any further evaluation of their male genitalia. *Belostoma lutarium* and *B. flumineum* are described as very similar species, which can be distinguished by the pilosity covering the connexivum only partially on the first species (Lauck 1964). Thus, it is possible that the sequences of *B. lutarium* downloaded from GenBank actually come from specimens of *B. flumineum*. Also, erroneous use of the name *B. flumineum* should be considered (F. Stefanello pers. comm.), because both species were once considered conspecific (Menke 1979). In any case, we are confident that mistakes exist concerning the identification of some specimens of the *B. flumineum* group, which highlights one of the pitfalls of accepting identifications on GenBank at face value.

At higher taxonomic levels, this study supports not only the monophyly of the *B. plebejum* and *B. flumineum* groups (which constituted the Pink and Light purple clades described above), but also the monophyly of the *B. oxyurum* group (given the clustering between the Yellow and Cyan clades) and of the small-bodied *Belostoma* species (given the clustering between the Yellow, Cyan, Pink and Purple clades) (Figure 2). However, the status of the *B. dentatum* group and of the medium and large-sized groupings of species remain yet to be assessed, in light of the polytomy recovered for the clade joining *B. angustum* (a medium-sized species) with *B. cummingsi*, *B. dentatum* and *B. ribeiroi* (which are large-sized species).

DNA Barcoding in the face of *Belostoma* diversity

One of the major issues related to DNA barcoding approaches is related to the co-amplification of nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs), which can overestimate the number of evaluated species (Song et al., 2008; Vyskočilová et al., 2018; Tay et al., 2017). Although there are no reports of NUMTs for Belostomatidae, there are also not enough studies showing they do not occur. Thus, to avoid making wrong inferences about taxonomic status and phylogenetic relationships, we decided to adopt two control strategies: 1) compare sequences in a search for in-frame stop codons or frameshifts, which are commonly encountered in ancient NUMTs (Bensasson et al., 2001); 2) amplify two mitochondrial genes and compare their individual evolutionary histories before advancing in the evaluations and concatenating both matrixes. In few words, if there were ambiguities between both mitochondrial markers, we would have indication of NUMTs affecting at least one of them; if results are congruent, there are strong evidence suggesting both are in fact linked mitochondrial genes. This occurs because NUMTs usually involve small DNA fragments (Bensasson et al. 2001; Richly & Leister, 2004), that commonly evolve at different substitution rates than their mitochondrial orthologous (Li et al., 1981). According to the first evaluation, we did not detect any nonsense mutations or frameshift in the set of evaluated sequences. Regarding congruence results, both markers recovered highly similar topologies, although they differed in their resolution levels (see below). Thus, we have good evidence suggesting that NUMTs are unlikely to influence our results.

The results obtained in the phylogenetic analyses suggest the division of COI and 16S datasets into ten and nine reciprocally monophyletic clades, respectively. When the ten clades are considered, the presence of a barcoding gap is confirmed for COI (despite the low Barcoding Gap value found for the Pink clade, driven by an isolated case of a divergent specimen of *B. estevezae*, possibly representing a cryptic species), but not for 16S. Although

we confirmed through the second test described above that the set sequences characterized for the two mitochondrial markers are effectively linked and share the same evolutionary history, variations in evolutionary rates explain the small difference found. In this case, the higher evolutionary rate usually found for COI in relation to 16S (Mueller 2006) results in a greater number of informative substitutions even for recent divergences, allowing the separation of clades Green and Blue, which appear grouped in the phylogeny of 16S. This lower resolution achieved by 16S, with greater overlap between intra- and interspecific distances, is similar to the results recently found by Wang et al. (2018) for spiders, where this marker was also less useful in species differentiation than COI.

Regarding specimen identification, DNA barcoding has proved to be an excellent tool, not only in highlighting the possible existence of taxonomic incongruities, but also in providing support for the identification of females and nymphs. Nymphs do not yet exhibit genitalia, making their morphological identification at the species level impossible through conventional identification keys. As for females, the use of external morphology for identification is often insufficient to distinguish between similar species. This is because most insect species descriptions and keys rely primarily on male genital traits, with female reproductive structures rarely described or illustrated. For this reason, we made a brief analysis of the internal morphology of four females representing subclades 3, 4, 5, and 6 of the Yellow clade. They differed from one another, for example, in the size of the ampoule (more or less inflated) and length of the spermatheca. Further studies involving analyses of female internal morphology are needed, both to evaluate polymorphisms or phenotypic plasticity of these species, and to improve on species-level identification keys by incorporating female genital characters. These traits may turn out to be complementary to the species-level identification of several *Belostoma* groups.

Regarding species discovery, we expected to find new species in our dataset, not only

because the Linnean shortfall is ubiquitous in insects (Diniz-Filho et al. 2010), but also due to difficulties in morphological identification of *Belostoma*, due to the scarcity of taxonomists and identification keys for the group, and also due to the extreme diversity of male genital morphology presented by these species. In fact, at the molecular level, evidence has emerged for two cases of putative new species: one represented by the specimen positioned as an early offshoot of the Pink clade, identified morphologically as *B. estevezae*; and the other related to the Blue clade, where no adult specimens were available to allow a more accurate evaluation. Moreover, although the presence of six potentially new species of the *B. oxyurum* group was suggested at the morphological level, DNA barcoding allowed us to revise these initial expectations. In any case, DNA barcoding has shown a great potential to speed up species delimitations in *Belostoma*.

***Belostoma* Phylogeny**

Our phylogeny suggests the subdivision of *Belostoma* species into three large groups: 1) *B. flumineum* group, a medium bodied group of species; 2) *B. oxyurum* + *B. plebejum* + *B. denticolle* groups, three small bodied group of species; and 3) *B. bifeveolatum* + *B. dentatum* + *B. testaceopallidum* groups, which encompass medium and moderately large to large bodied groups of species, respectively. In this sense, this study supports the monophyly of the small body sized group of *Belostoma* species. However, it leaves open the question whether the large and medium bodied groupings have any biological meaning, or whether the monophyly of the small bodied species will be robust to the inclusion of more species.

Thus, although our phylogeny reflects a single gene tree, which cannot be directly compared with the phylogeny presented by Ribeiro et al. (2018) due to non-overlapping sampling, its results certainly constitute a first step towards improving our knowledge of the Neotropical *Belostoma* fauna, which seems to be highly diverse. Further studies involving

both integrative taxonomic analysis and internal and external morphological description and re-description are required, and it is important that they provide a more solid support for female identification. Within this framework, it would also be important to re-examine the type species and resample from the type localities. Other molecular markers should also be integrated into the analyses in order to provide a more robust phylogenetic hypothesis for the genus, and a species tree obtained under multi-locus or even phylogenomic approaches would be especially welcomed. After all, only the integration of works and the association of results obtained in different areas can provide more robust information about the evolution of this complex, diverse, but still largely neglected group of species. With this information in mind, modifications to the taxonomy will likely be necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge IBAMA/ICMBio (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente—Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) for issuing the collection permit 49833-1, 2 and 3/2016 under the collection number 46140, on behalf of Augusto Ferrari. We also acknowledge CGEN/SISGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético—Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) for issuing the license under registration number A85CDD7. This study was supported by Universal-CNPq/2014 (process number 447259/2014-8). T.B.G. received a research grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES (Finance Code 001). We have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

ABGD Web. 2019. *Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation*. <<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>> 10nd September 2019.

492 Appasus major Esaki, 1934 in Guala, G., Döring, M. 2020. Integrated Taxonomic Information
 493 System (ITIS). National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. Checklist
 494 dataset <https://doi.org/10.15468/rjarmt> accessed via GBIF.org on 2020-09-01.

495 Bandelt, H.J., Forster, P & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific
 496 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.

497 Barrett, R.D. & Hebert, P.D. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian*
 498 *Journal of Zoology*, **83**, 481–491.

499 Bensasson, D., Zhang, D., Hartl, D.L. & Hewitt, G.M. 2001. Mitochondrial pseudogenes:
 500 evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 314-321.

501 Cognato, A.I. & Vogler, A.P. 2001. Exploring data interaction and nucleotide alignment in a
 502 multiple gene analysis of *Ips* (Coleoptera: Scolytinae). *Systematic Biology*, **50**, 758–780.

503 Consoli, R. A. G. B., Pereira, M. H., Melo, A. L. & Pereira, L.H. 1989. *Belostoma*
 504 *micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of
 505 *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo*
 506 *Cruz*, **84**, 577-578.

507 De Carlo, J.A. 1935. Familia Belostomidae: descripción de una nueva especie y algunas
 508 sinonimias. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, **7**, 202–205.

509 Dimmock, G. 1887. Belostomidae and other fish-destroying bugs. *Zoologist*, **11**, 101-105.

510 Diniz-Filho, J.A.F., Marco, P. & Hawkins, B.A 2010. Defying the curse of ignorance:
 511 perspectives in insect macroecology and conservation biogeography. *Insect Conservation and*
 512 *Diversity*, **3**, 172-179.

513 Dinno, A. 2018. Horn's Test of Principal Components/Factors.
 514 http://alexisdinno.com/Software/files/PA_for_PCA_vs_FA.pdf
 515 *Diplonychus rusticus* Fabricius, 1871 in Guala, G., Döring, M. 2020. Integrated Taxonomic
 516 Information System (ITIS). National Museum of Natural History, Smithsonian Institution.
 517 Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/rjarmt> accessed via GBIF.org on 2020-09-01.
 518 Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with
 519 BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969–1973.
 520 Estévez, A.L. & Polhemus, J.T. 2001. The small species of *Belostoma* (Heteroptera,
 521 Belostomatidae). Key to species groups and a revision of the *denticolle* group. *Iheringia*.
 522 *Série Zoologia*, **91**, 151-158.
 523 Estévez, A.L., Polhemus, J.T. 2007. The small species of *Belostoma* (Heteroptera:
 524 Belostomatidae). Revision of *plebejum* group. *Revista de Biología Tropical*, **55**, 147-155.
 525 Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to
 526 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*
 527 *Resources*, **10**, 564–567.
 528 Ezard, T., Fujisawa, T., Barraclough, T. 2019. splits: SPecies' LImits by Threshold Statistics.
 529 <https://r-forge.r-project.org/projects/splits/>
 530 Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for
 531 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan
 532 invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
 533 Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Capiroli, M., Melone, G., Ricci, C. &
 534 Barraclough, T.G. 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS*
 535 *Biology*, **5**, e87.

536 Fujisawa, T. & Barraclough, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the
537 Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated
538 data sets. *Systematic Biology*, **62**, 707–724.

539 Giam, X., Scheffers, B.R., Sodhi, N.S., Wilcove, D.S., Ceballos, G. & Ehrlich, P.R. 2012.
540 Reservoirs of richness: least disturbed tropical forests are centres of undescribed species
541 diversity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **279**, 67–76.

542 Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications
543 through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–
544 321.

545 Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004. Identification of birds
546 through DNA barcodes. *PLOS Biology*, **2**, e312

547 Hinshaw, S.H. & Sullivan, B.K. 1990. Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer*
548 during reproduction. *Journal of Herpetology*, **24**, 196–197.

549 Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees.
550 *Bioinformatics*, **17**, 754–755.

551 Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T. & Calcott, B. 2017. PartitionFinder 2:
552 New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and
553 Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **34**, 772–773.

554 Latreille, P.A. 1807. Genera Crustaceorum et Insectorum Secundum Ordinem Naturalem in
555 Familias Disposita, *Iconibus Exemplisque Plurimis Explicata*, **3**. Parisiis et Argentorati:
556 Amand Koenig.

557 Lauck, D.R. & Menke, A.S. 1961. The Higher Classification of the Belostomatidae
558 (Hemiptera). *Annals of the Entomological Society of America*, **54**, 644–657

- 559 Lauck, D.R. 1962. A monograph of the genus *Belostoma* (Hemiptera) Part I. Introduction to
560 *B. dentatum* and *subspinosum* groups. *Bulletin of the Chicago Academy of Sciences*, **11**, 34-
561 81.
- 562 Lauck, D.R. 1964. A monograph of the genus *Belostoma* (Hemiptera) Part. III. *B. triangulum*,
563 *bergi*, *minar*, *bifoveolatum* and *flumineum* groups. *Bulletin of the Chicago Academy of*
564 *Sciences*, **11**, 102-154.
- 565 Li, W. H., Gojobori, T., Nei, M. 1981. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution.
566 *Nature*, **292**, 237-239.
- 567 Machado, S., Santos, J.P.J., Fonseca, P.M., Bolzan, A.R., David, J., Loreto, E.L.S.,
568 Gottschalk, M.S. & Robe, L.J. 2017. Neotropical mycophagous drosophilids (Diptera:
569 Drosophilidae): DNA barcoding as a way of overcoming the taxonomic impediment. *Insect*
570 *Conservation and Diversity*, **10**, 271-281.
- 571 Mahner M. 1993. Systema Cryptoceratorum Phylogenicum (Insecta, Heteroptera).
572 *Zoologica*, **48**, 1–302.
- 573 Martínez-Delclòs, X., Nel, A. & Popov, Y.A. 1995. Systematics and functional morphology
574 of *Iberonepa romerali* n. gen. and sp., Belostomatidae from the Spanish Lower Cretaceous
575 (Insecta, Heteroptera). *Journal of Paleontology*, **69**, 496–508.
- 576 May, R. M. 2010. Tropical arthropod species, more or less? *Science*, **329**, 41-42.
- 577 Mayr, G. 1863. Hemipterogische Studien. Die Belostomiden. *Verhandlungen der Zoologisch-*
578 *Botanischen Gesellschaft Wien*, **13**, 339–364.
- 579 Menke, A.E. 1979. The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California (Heteroptera:
580 Hemiptera). *Bulletin of the California Insect Survey*, **21**, 1-666.

581 Menke, A.S. 1965. A new South American toe biter (Hemiptera, Belostomatidae).
 582 *Contributions in Science*, **89**, 2–4.

583 Merritt, R.W. & Cummins, K.W. 1996. *An introduction to the aquatic insects of North*
 584 *America*. Kendal/Hunt Publishing Company, Dubuque, EUA.

585 Michonneau, F., Bolker, B., Holder, M., Lewis, P., O’Meara, B. 2020. An Interface to the
 586 Nexus Class Library. <https://github.com/fmichonneau/rncl>

587 Moczek, A.P. 2010. Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Philosophical Transactions*
 588 *of the Royal Society B*, **365**, 593–603.

589 Montandon, A.L. 1903. Hémiptères aquatiques. Notes synonymiques et géographiques,
 590 descriptions d’espèces nouvelles. *Buletinul Societatii Române de Sciinte*, **12**, 97–121.

591 Monte, O. 1945. Baratas d’água (especial). *Chácaras Ouint*, **71**, 454-458.

592 Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. 2011. How Many Species Are
 593 There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, **9**, 1-8.

594 Moreira, F.F.F., Barbosa, J.F., Ribeiro, J.R.I. and Alecrim, V.P. 2011. Checklist and
 595 distribution of semiaquatic and aquatic Heteroptera (Gerromorpha and Nepomorpha)
 596 occurring in Brazil. *Zootaxa*, **2958**, 1-74.

597 Mueller, R.L. 2006. Evolutionary Rates, Divergence Dates, and the Performance of
 598 Mitochondrial Genes in Bayesian Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, **55**, 289–300.

599 National Center for Biotechnology Information. 2019. *The National Center for Biotechnology*
 600 *Information*. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> 15nd September 2019.

601 NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology
 602 Information. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(D1):D8-D13.

603 Nieser, N. 1975. The water bugs (Heteroptera: Nepomorpha) of the Guyana Region.
 604 *Uitg.natuurw Studkring Suriname*, **16**, 88-128.

605 Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in
 606 R language. *Bioinformatics*, **20**, 289–290,

607 Pereira, M.H., Melo, A.L. & Pereira, L.H. 1991. Laboratory rearing of *Belostoma micantulum*
 608 Stål, 1858 (Hemiptera, Belostomatidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **53**, 603-606.

609 Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazel, S., Kamoun,
 610 S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA
 611 taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, **55**, 595–609.

612 R Development Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing.
 613 Available at: R. Foundation for Statistical Computing, Version 4.0.2.
 614 <https://www.Rproject.org/>.

615 Ratnasingham, S., Hebert, P.D. 2007. bold: The Barcode of Life Data System
 616 (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, **7**, 355–364.

617 Ribeiro, J.R.I. & Alecrim, V.P. 2008. Duas novas espécies de *Belostoma* Latreille, 1807
 618 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) do grupo *plebejum* sensu Nieser. 1975.. *Acta*
 619 *Amazonica*, **38**, 179-188.

620 Ribeiro, J.R.I. & Estévez, A.L. 2009. Small species of *Belostoma* Latreille (Heteroptera,
 621 Belostomatidae). III. A revision of *oxyurum* group with a new species from Brazil and
 622 description of the male of *B. noualhieri* Montandon. *Revista Brasileira de Entomologia*, **53**,
 623 207–215.

624 Ribeiro, J.R.I. 1999. Revisão das espécies de *Belostoma* Latreille, 1807 (Insecta: Heteroptera:
 625 Belostomatidae) ocorrentes no sudeste do Brasil.
 626 Ribeiro, J.R.I. 2007. A review of the species of *Belostoma* Latreille, 1807 (Insecta,
 627 Heteroptera, Belostomatidae) from the four southeastern Brazilian states. *Zootaxa*, 1477: 1-
 628 70.
 629 Ribeiro, J.R.I., Estévez, A.L., Moreira, F.F.F. & Guilbert, E. 2017. Revision of the *Belostoma*
 630 *dentatum* group *sensu* Nieser (Insecta, Heteroptera, Belostomatidae). *Zootaxa*, **4276**, 177-203.
 631 Ribeiro, J.R.I., Ohba, S., Pluot-Sigwalt, D., Stefanello, F., Bu, W., Meyin-A-Ebong, S.E. &
 632 Guilbert, E. 2018. Phylogenetic analysis and revision of subfamily classification of
 633 Belostomatidae genera (Insecta: Heteroptera: Nepomorpha). *Zoological Journal of the*
 634 *Linnean Society*, **20**, 1-41.
 635 Richly, E., Leister, D. 2004. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Molecular Biology*
 636 *and Evolution*, **21**, 1081–1084.
 637 Robins, J.H., Hingston, M., Matisoo-Smith, E. & Ross, H.A. 2007. Identifying *Rattus* species
 638 using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 717–729.
 639 Say. Descript. New Species. 1831. *N. Amer. Insects*, 12-13.
 640 Schuh, R.T. & Slater, J.A. 1995. *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*. Cornell
 641 University Press, New York.
 642 Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution,
 643 weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of
 644 conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of*
 645 *America*, **87**, 651–701.

646 Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA
647 barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are
648 coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(36), 13486-13491.

649 Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, **5**, 233-
650 241.

651 Stål, C. 1862. Hemiptera mexicana enumeravit speciesque novas descripsit (continuatio).
652 *Stettiner Entomologische Zeitung*, **23**, 437–462.

653 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular
654 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-
655 2729.

656 Tay, W.T., Elfekih, S., Court1, L.N., Gordon, K.H.J., Delatte, H., De Barro, P.J. 2017. The
657 Trouble with MEAM2: Implications of Pseudogenes on Species Delimitation in the Globally
658 Invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Cryptic Species Complex. *Genome*
659 *Biology and Evolution*, **9**(10), 2732–2738.

660 Vyskočilová1, S., Tay, W.T., Brunschot1, S., Seal1, S., Colvin, J. 2018. An integrative
661 approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* whitefly species complex.
662 *Scientific Reports*, **8**(10886).

663 Wang, Z.L., Yang, X.Q., Wang, T.Z. & Yu, X. 2018.. Assessing the effectiveness of
664 mitochondrial COI and 16S rRNA genes for DNA barcoding of farmland spiders in China.
665 *Mitochondrial DNA Part A*, **29**, 695–702.

666 Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding
667 Australia’s fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological*
668 *Science*, **360**, 1847–185.

Tables

Table 1. Ranges of intra and inter-clade COI distances for each of the retrieved clades.

Clades		Min distance (%)	Max distance (%)	BG ¹
Yellow	Intra-clade	0.00	1.25	9.38
	Inter-clade	10.63	18.68	
Cyan	Intra-clade	0.00	0.00	9.00
	Inter-clade	9.00	18.54	
Pink	Intra-clade	0.00	8.62	0.38
	Inter-clade	9.00	14.81	
Purple	Intra-clade	0.15	2.03	9.05
	Inter-clade	11.08	15.97	
Grey	Intra-clade	0.00	1.95	9.82
	Inter-clade	11.77	18.68	
Red	Intra-clade	0.00	1.24	9.29
	Inter-clade	10.53	16.06	
Light pink	Intra-clade	0.00	0.00	14.18
	Inter-clade	14.18	18.30	
Green	Intra-clade	0.00	1.04	2.25
	Inter-clade	3.29	17.47	
Blue	Intra-clade	0.00	0.00	3.29
	Inter-clade	3.29	17.56	
Light purple	Intra-clade	0.00	9.92	2.98
	Inter-clade	12.90	18.54	

¹Barcode gap (subtraction of the maximum intra-clade distance from the minimum inter-clade distance).

Table 2. Ranges of intra and inter-clade 16S distances for each of the retrieved clades.

Clades		Min distance (%)	Max distance (%)	BG¹
Yellow	Intra-clade	0.00	1.36	3.49
	Inter-clade	4.85	8.00	
Cyan	Intra-clade	0.00	0.00	4.85
	Inter-clade	4.85	7.00	
Pink	Intra-clade	0.00	3.24	1.83
	Inter-clade	5.07	6.65	
Purple	Intra-clade	0.00	0.00	5.37
	Inter-clade	5.37	7.97	
Grey	Intra-clade	0.00	0.67	0.85
	Inter-clade	1.52	5.90	
Red	Intra-clade	0.00	3.13	-0.71
	Inter-clade	2.42	5.87	
Light pink	Intra-clade	0.00	0.66	2.10
	Inter-clade	2.76	6.99	
Green	Intra-clade	0.00	0.35	-0.34
	Inter-clade	0.0012	6.10	
Blue	Intra-clade	0.00	0.66	-0.65
	Inter-clade	0.0012	5.97	
Light purple	Intra-clade	0.00	0.33	4.07
	Inter-clade	4.40	7.31	

¹Barcode gap (subtraction of the maximum intra-clade distance from the minimum inter-clade distance).

Figure Legends

Figure 1. Map of South America highlighting the Brazilian states where the collections were made (São Paulo, Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul). Two sampling points outside South America, reported for sequences downloaded from GenBank or BOLD (located in Texas and Kansas – USA) have not been shown in the map. Each symbol refers to a single collection point.

Figure 2. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of the concatenated dataset including 650 bp of COI and 302 bp of 16S. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

Supplementary Material:

Figure S1. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 650 bp fragment of the COI gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

Figure S2. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 302 bp fragment of the 16S gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

Figure S3. Ampulla-like part and spermatheca of females of subclade 3 (a), subclade 4 (b), subclade 5 (c) and subclade 6 (d) of the Yellow clade (Fig. 2).

Figure S4. Genitalia of males positioned across the large polytomy of the Yellow clade (Fig. 2), and provisionally identified as *Belostoma* sp. 1 (a), *Belostoma* sp. 2 (b), *Belostoma* sp. 3 (c) *B. sanctulum* (aff.) (d) .

Figure S5. Male identified as *B. horvathi* (aff.) along the Yellow clade (Fig. 2), with detach to (a) prosternal carena and (b) genitalia.

Table S1. New *Belostoma* species collected in this study with their respective sexes, collection points, geographic coordinates and GenBank accession numbers.

Table S2. Sequences of *Belostoma* and outgroup species downloaded from GenBank or BOLD.

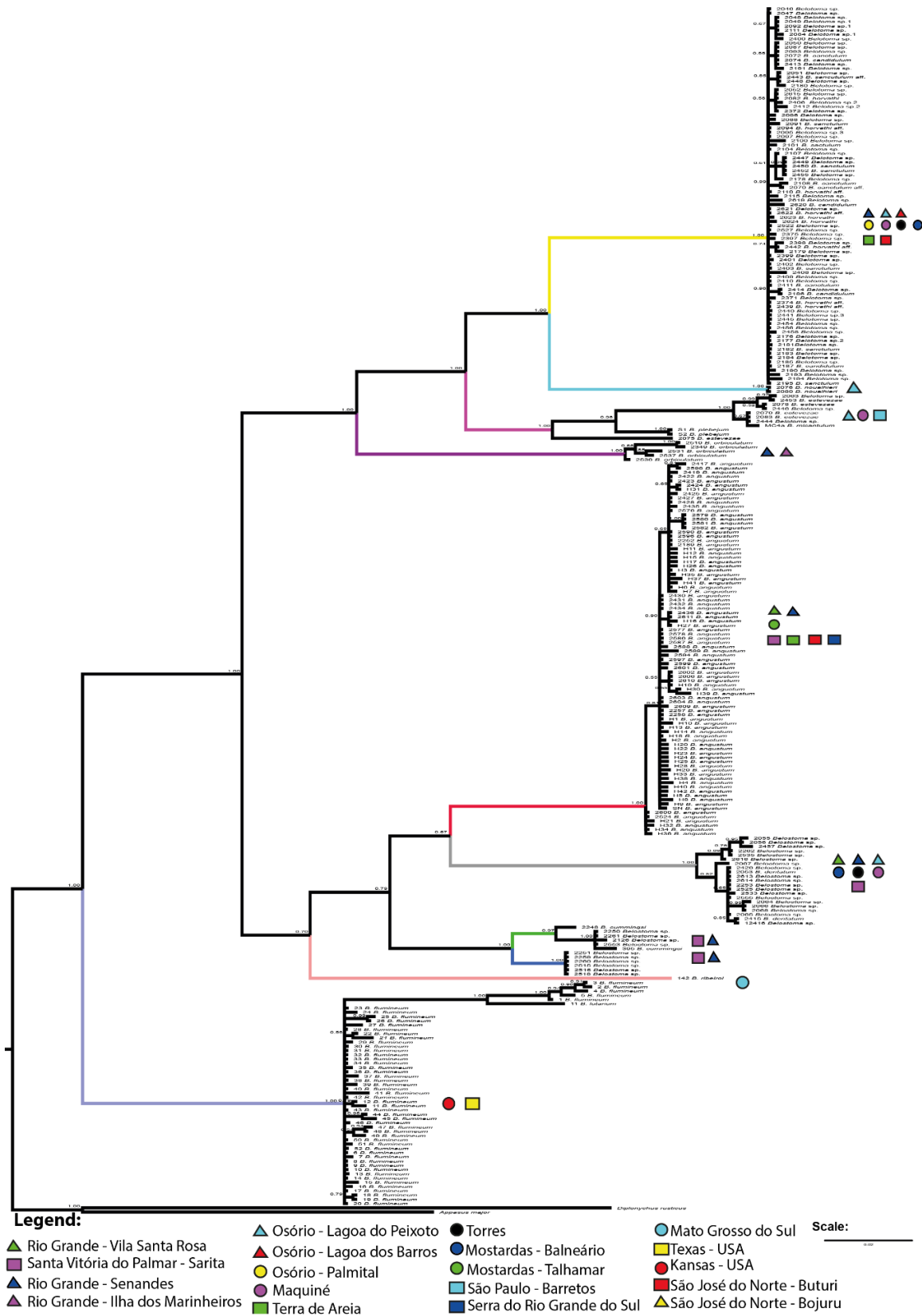


Figure S1. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 650 bp fragment of the COI gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

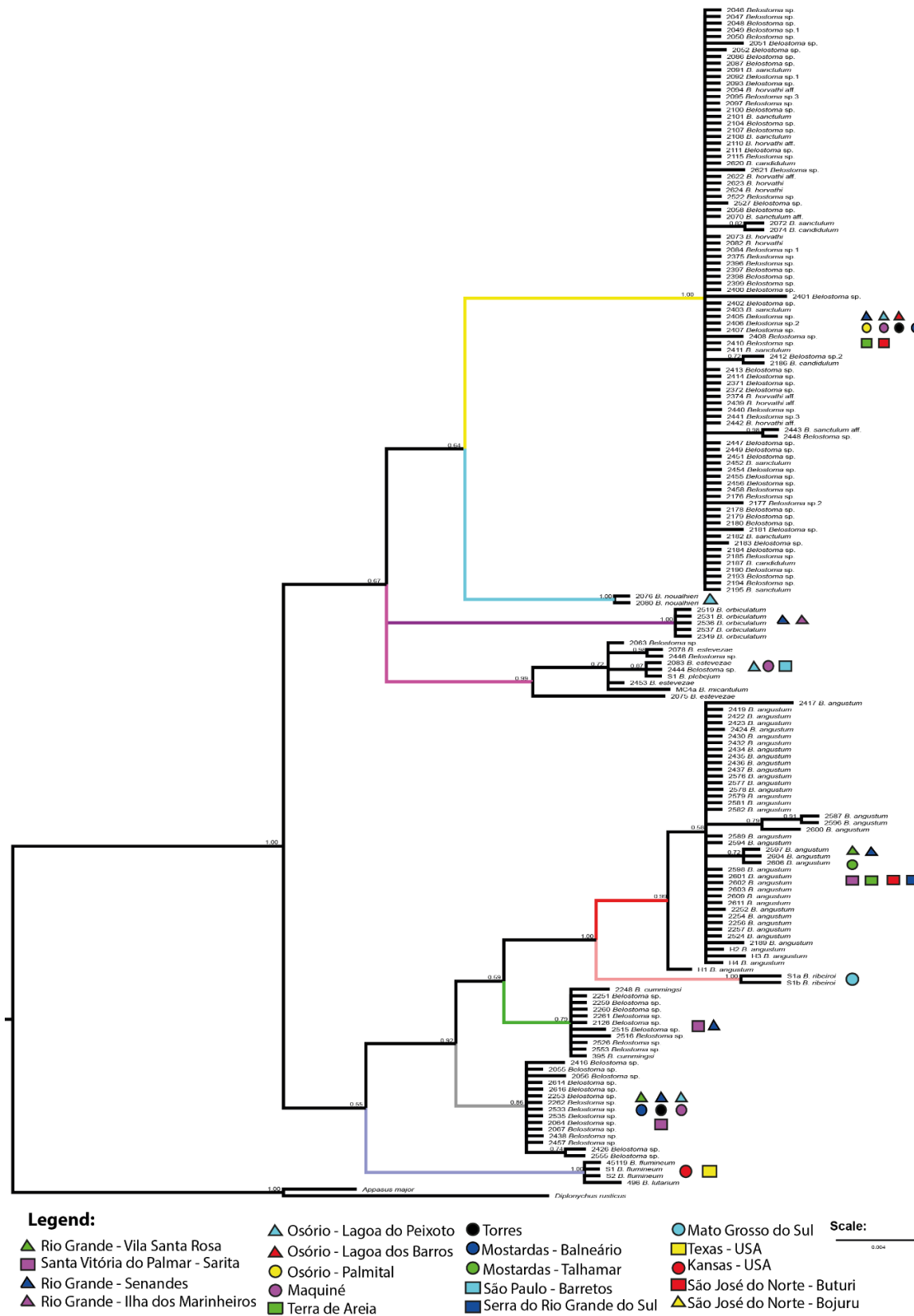


Figure S2. Phylogenetic tree generated through Bayesian analysis of a 302 bp fragment of the 16S gene. Branch sizes are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. The numbers on the internal branches refer to the Posterior Probability of each clade. The colours of the branches refer to the composition of each of the clades, whereas symbols to the right refer to the different collection points.

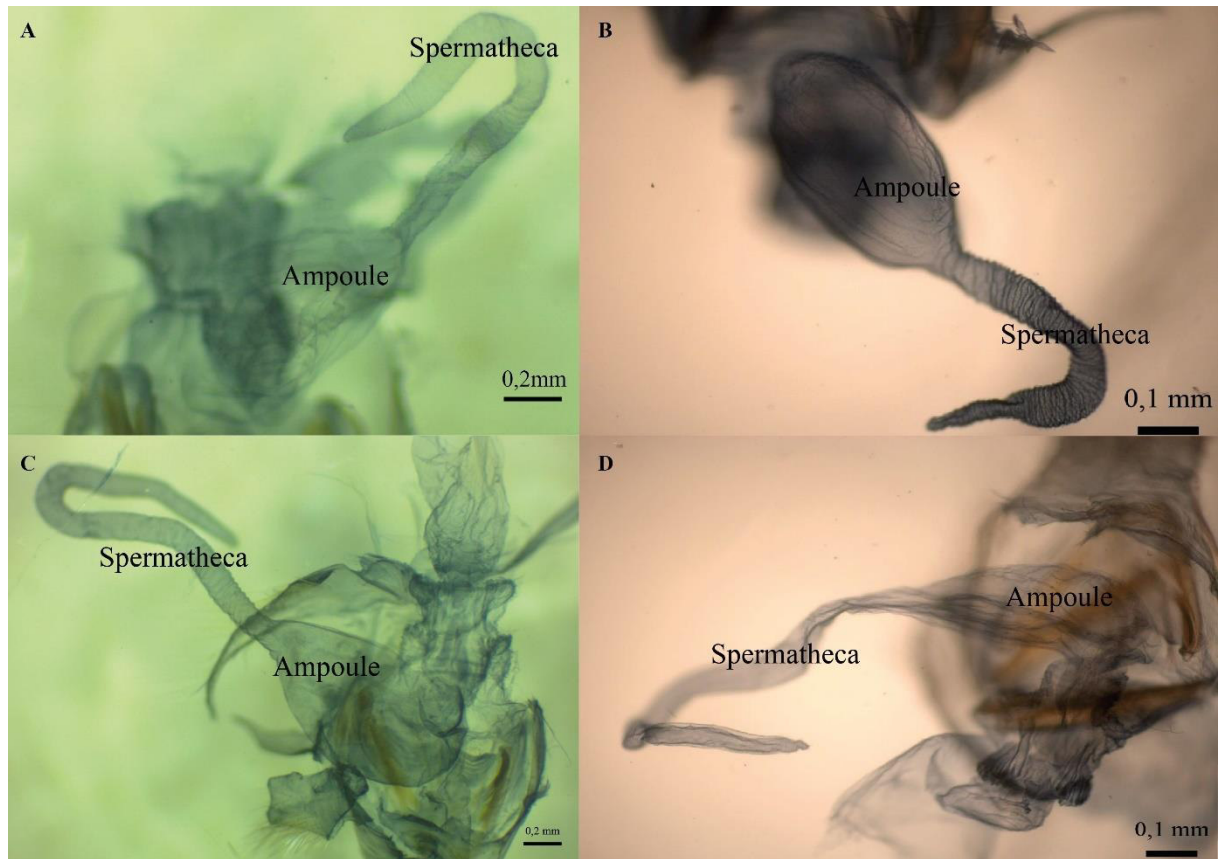


Figure S3. Ampulla-like part and spermatheca of females of subclade 3 (a), subclade 4 (b), subclade 5 (c) and subclade 6 (d) of the Yellow clade (Fig. 2).

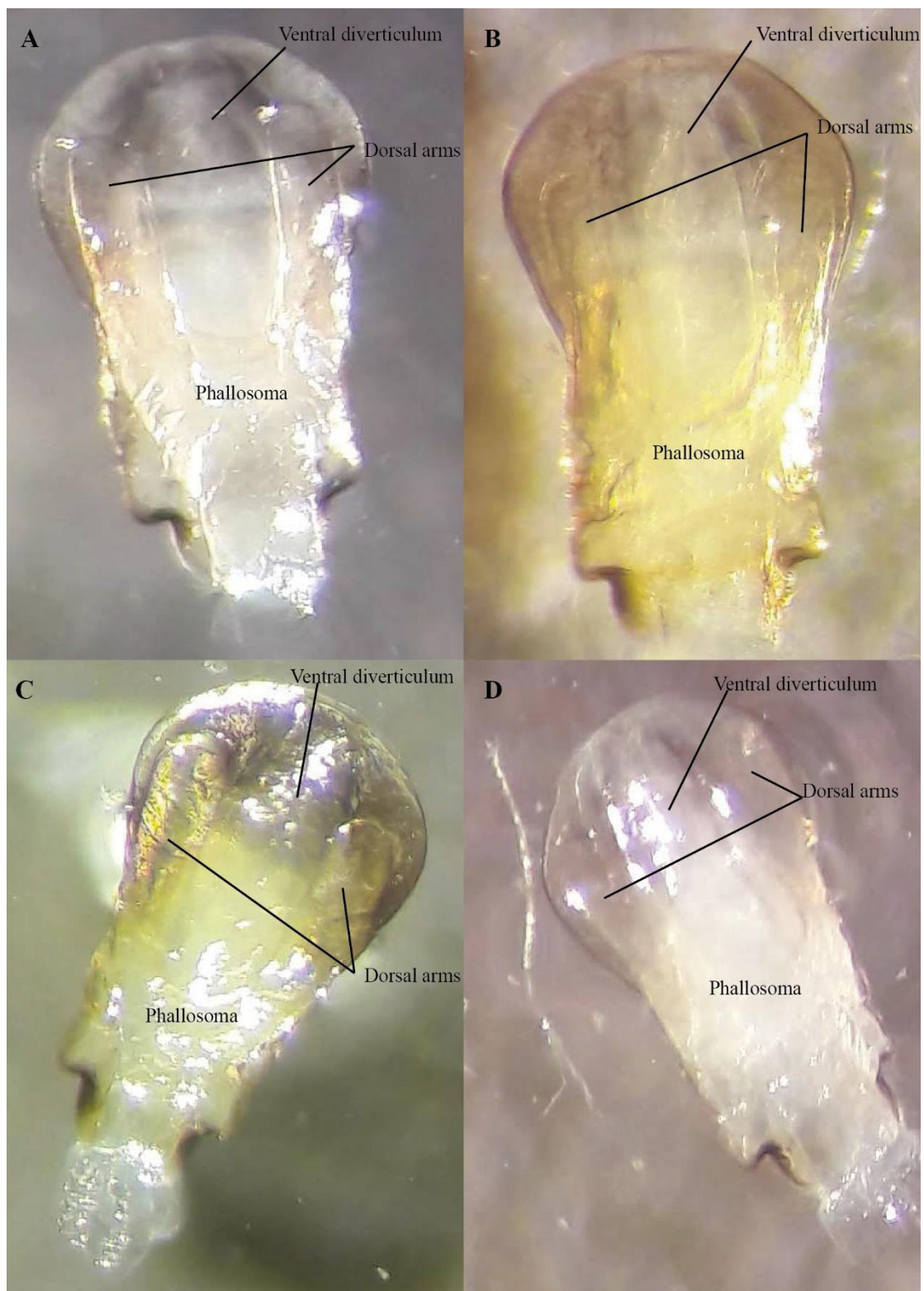


Figure S4. Genitalia of males positioned across the large polytomy of the Yellow clade (Fig. 2), and provisionally identified as *Belostoma* sp. 1 (a), *Belostoma* sp. 2 (b), *Belostoma* sp. 3 (c) *B. sanctulum* (aff.) (d) .

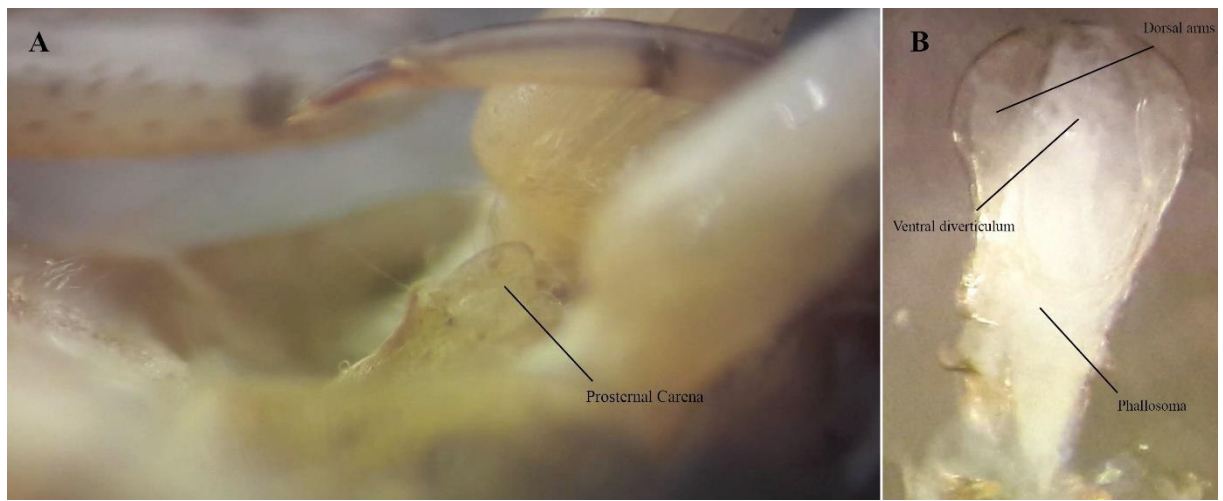


Figure S5. Male identified as *B. horvathi* (aff.) along the Yellow clade (Fig. 2), with detach to (a) prosternal carina and (b) genitalia.

Table S1. New *Belostoma* species collected in this study, with their respective sexes, collection points, geographic coordinates and GenBank accession numbers.

Sample	Body size categories	Groups	Species	Sex	Life stage	cycle	City	Geographic coordinates		GenBank accession numbers	
								Long	Lat	COI	16SrRNA
2074	Small	<i>oxyurum</i>	<i>Belostoma candidulum</i>	male	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816936	MN824353
2186			<i>Belostoma candidulum</i>	male	adult		Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN816950	MN824411
2187			<i>Belostoma candidulum</i>	male	adult		Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN816951	MN824412
2620			<i>Belostoma candidulum</i>	male	adult		Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN816915	MN824298
2073			<i>Belostoma horvathi</i>	male	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	#	MN824352
2082			<i>Belostoma horvathi</i>	female	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816942	MN824358
2374			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		Osório	-50.188850	-29.825493	MN816960	MN824381
2439			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816961	MN824383
2442			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816962	MN824386
2094			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816956	MN824285
2110			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816957	MN824293
2622			<i>Belostoma horvathi</i> aff.	male	adult		Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN816958	MN824300
2623			<i>Belostoma horvathi</i>	female	adult		Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN816916	MN824301
2624			<i>Belostoma horvathi</i>	female	adult		Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN816917	MN824302
2076			<i>Belostoma noualhieri</i>	male	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816938	MN824355
2080			<i>Belostoma noualhieri</i>	male	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816941	MN824357
2070			<i>Belostoma sanctulum</i> aff.	male	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816959	MN824350
2072			<i>Belostoma sanctulum</i>	female	adult		Osório	-50.243762	-29.854342	MN816934	MN824351
2403			<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult		Osório	-50.301075	-29.914193	MN816944	MN824369
2411			<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult		Osório	-50.301075	-29.914193	MN816945	MN824375
2443			<i>Belostoma sanctulum</i> aff.	male	adult		Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816963	MN824387
2450			<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult		Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816946	#
2452			<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult		Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816947	MN824394
2182			<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult		Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN816949	MN824407

2195	<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN816953	MN824417
2091	<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816912	MN824282
2101	<i>Belostoma sanctulum</i>	male	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816913	MN824289
2108	<i>Belostoma sanctulum</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816914	MN824292
2396	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	male	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	#	MN824362
2397	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817047	MN824363
2398	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817048	MN824364
2399	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817049	MN824365
2400	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817050	MN824366
2401	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817051	MN824367
2402	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817052	MN824368
2405	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	#	MN824370
2407	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	#	MN824372
2408	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817055	MN824373
2409	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817056	#
2410	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817057	MN824374
2413	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817059	MN824377
2414	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817060	MN824378
2440	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817063	MN824384
2445	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817066	#
2447	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817068	MN824390
2448	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817069	MN824391
2449	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817070	MN824392
2451	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	male	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	#	MN824393
2454	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817071	MN824396
2176	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817076	MN824401
2178	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817078	MN824403
2179	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817079	MN824404
2180	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817080	MN824405
2181	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817081	MN824406
2183	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817082	MN824408

2184	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817083	MN824409
2185	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817084	MN824410
2190	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817085	MN824414
2191	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817086	#
2193	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817087	MN824415
2194	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817088	MN824416
2046	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816975	MN824265
2047	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816976	MN824266
2048	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	male	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816977	MN824267
2050	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816979	MN824269
2051	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816980	MN824270
2052	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816981	MN824271
2086	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816989	MN824279
2087	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816990	MN824280
2088	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816991	#
2093	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816993	MN824284
2097	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816995	MN824287
2100	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816996	MN824288
2104	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816997	MN824290
2107	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816998	MN824291
2111	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	male	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816999	MN824294
2621	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817006	MN824299
2598	<i>Belostoma sp. oxyurum group</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817009	MN824308
2084	<i>Belostoma sp. 1</i>	male	adult	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817045	MN824360
2406	<i>Belostoma sp. 2</i>	male	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817054	MN824371
2412	<i>Belostoma sp. 2</i>	male	adult	Osório	-50.301075	-29.914193	MN817058	MN824376
2441	<i>Belostoma sp. 3</i>	male	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817064	MN824385
2177	<i>Belostoma sp. 2</i>	male	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN817077	MN824402
2049	<i>Belostoma sp. 1</i>	male	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816978	MN824268
2092	<i>Belostoma sp. 1</i>	male	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816992	MN824283
2095	<i>Belostoma sp. 3</i>	male	adult	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN816994	MN824286

2075		<i>plebejum</i>	<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Osório	-50.243762	-29.854342	MN816937	MN824354
2078			<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Osório	-50.243762	-29.854342	MN816939	MN824356
2079			<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Osório	-50.243762	-29.854342	MN816940	#
2083			<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Osório	-50.243762	-29.854342	MN816943	MN824359
2444			<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817065	MN824388
2446			<i>Belostoma estevezae</i>	female	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817067	MN824389
2453			<i>Belostoma estevezae</i>	male	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN816948	MN824395
2519		<i>denticolle</i>	<i>Belostoma orbiculatum</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN816928	MN824332
2531			<i>Belostoma orbiculatum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN816930	MN824337
2536			<i>Belostoma orbiculatum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN816931	MN824340
2537			<i>Belostoma orbiculatum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN816932	MN824341
2349			<i>Belostoma orbiculatum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.133400	-32.016900	MN816933	MN824344
2430	Medium	<i>bifoveolatum</i>	<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816974	MN824259
2431			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816904	#
2432			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816905	MN824260
2434			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816906	MN824261
2435			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816907	MN824262
2436			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816908	MN824263
2437			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	#	MN824264
2252			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN816926	MN824320
2254			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	#	MN824322
2256			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	#	MN824323
2524			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN816929	MN824334
2189			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Terra de Areia	-50.105048	-29.640833	MN816952	MN824413
2576			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816910	MN824274
2577			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816911	MN824275
2586			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817007	#
2587			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817008	MN824303
2588			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816918	#
2589			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816919	MN824304
2590			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816920	#

2594			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816921	MN824305
2596			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816922	MN824306
2597			<i>Belostoma angustum</i>	male	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816923	MN824307
2599			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816924	#
2600			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817010	MN824309
2601			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817011	MN824310
2602			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN816925	MN824311
2603			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817012	MN824312
2604			<i>Belostoma angustum</i>	female	adult	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817013	MN824313
2415	Large	<i>dentatum</i>	<i>Belostoma dentatum</i>	female	adult	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816903	#
2248			<i>Belostoma cummingsi</i>	male	adult	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN816954	MN824317
2438			<i>Belostoma dentatum</i>	male	adult	Maquiné	-50.149093	-29.694526	#	MN824382
2053			<i>Belostoma dentatum</i>	male	adult	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816909	#
2416	Nymphs	-	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816964	MN824252
2417			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816965	MN824253
2419			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816966	MN824254
2422			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816967	MN824255
2423			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816968	MN824256
2424			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816969	MN824257
2425			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816970	#
2426			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816971	MN824258
2427			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816972	#
2428			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.197430	-32.091750	MN816973	#
2250			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817018	#
2251			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817019	MN824319
2253			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817020	MN824321
2257			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817021	MN824324
2258			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817022	#
2259			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817023	MN824325
2260			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817024	MN824326
2261			<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817025	MN824327

2262	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Santa Vitória do Palmar	-52.436100	-32.679100	MN817026	MN824328
2126	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817027	MN824329
2515	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817028	MN824330
2516	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817029	MN824331
2518	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817030	#
2522	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817031	MN824333
2525	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817032	#
2526	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	#	MN824335
2527	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817034	MN824336
2533	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817035	MN824338
2535	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817036	MN824339
2553	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817037	MN824342
2555	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Rio Grande	-52.281000	-32.247800	MN817038	MN824343
2058	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	#	MN824345
2063	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817039	MN824346
2064	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817040	MN824347
2065	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817041	#
2066	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817042	#
2067	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817043	MN824349
2068	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817044	#
2375	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.243762	-29.854342	MN817046	MN824361
2371	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.188850	-29.825493	MN817061	MN824379
2372	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Osório	-50.188850	-29.825493	MN817062	MN824380
2455	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817072	MN824397
2456	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817073	MN824398
2457	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817074	MN824399
2458	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Maquiné	-50.149093	-29.694526	MN817075	MN824400
2055	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816982	MN824272
2056	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Torres	-49.786555	-29.369406	MN816983	MN824273
2578	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816984	MN824418
2579	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816985	MN824276

2580	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816986	#
2581	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816987	MN824277
2582	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.728500	-31.846200	MN816988	MN824278
2115	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	São José do Norte	-51.276100	-31.519300	MN817000	MN824295
2613	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817001	#
2614	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817002	MN824296
2615	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817003	#
2616	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817004	MN824297
2619	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.855400	-31.114700	MN817005	#
2606	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817014	MN824314
2609	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817015	MN824315
2610	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817016	#
2611	<i>Belostoma sp.</i>	*	nymph	Mostardas	-50.961800	-31.261600	MN817017	MN824316

Table S2. Sequences of *Belostoma* and outgroups downloaded from GenBank or BOLD.

Sample Code	Body size categories	Groups	Species	GenBank/BOLD accession numbers	
				COI	16SrRNA
MC4a	Small	<i>plebejum</i>	<i>Belostoma micantulum</i>	JN689496	KC594821
S1			<i>Belostoma plebejum</i>	KY320476	KY389097
S2			<i>Belostoma plebejum</i>	KY320479	#
SN	Medium	<i>bifoveolatum</i>	<i>Belostoma angustum</i>	KY320477	#
H1			<i>Belostoma angustum</i>	MG066539	MG209117
H2			<i>Belostoma angustum</i>	MG066540	MG209118
H3			<i>Belostoma angustum</i>	MG066541	MG209119
H4			<i>Belostoma angustum</i>	MG066542	MG209120
H5			<i>Belostoma angustum</i>	MG066543	#
H6			<i>Belostoma angustum</i>	MG066544	#
H7			<i>Belostoma angustum</i>	MG066545	#
H8			<i>Belostoma angustum</i>	MG066546	#
H9			<i>Belostoma angustum</i>	MG066547	#
H10			<i>Belostoma angustum</i>	MG066548	#
H11			<i>Belostoma angustum</i>	MG066549	#
H12			<i>Belostoma angustum</i>	MG066550	#
H13			<i>Belostoma angustum</i>	MG066551	#
H14			<i>Belostoma angustum</i>	MG066552	#
H15			<i>Belostoma angustum</i>	MG066553	#
H16			<i>Belostoma angustum</i>	MG066554	#
H17			<i>Belostoma angustum</i>	MG066555	#
H18			<i>Belostoma angustum</i>	MG066556	#
H19			<i>Belostoma angustum</i>	MG066557	#
H20			<i>Belostoma angustum</i>	MG066558	#
H21			<i>Belostoma angustum</i>	MG066559	#
H22			<i>Belostoma angustum</i>	MG066560	#
H23			<i>Belostoma angustum</i>	MG066561	#
H24			<i>Belostoma angustum</i>	MG066562	#
H25			<i>Belostoma angustum</i>	MG066563	#
H26			<i>Belostoma angustum</i>	MG066564	#
H27			<i>Belostoma angustum</i>	MG066565	#
H28			<i>Belostoma angustum</i>	MG066566	#
H29			<i>Belostoma angustum</i>	MG066567	#
H30			<i>Belostoma angustum</i>	MG066568	#
H31			<i>Belostoma angustum</i>	MG066569	#
H32			<i>Belostoma angustum</i>	MG066570	#
H33			<i>Belostoma angustum</i>	MG066571	#
H34			<i>Belostoma angustum</i>	MG066572	#
H35			<i>Belostoma angustum</i>	MG066573	#
H36			<i>Belostoma angustum</i>	MG066574	#
H37			<i>Belostoma angustum</i>	MG066575	#
H38			<i>Belostoma angustum</i>	MG066576	#
H39			<i>Belostoma angustum</i>	MG066577	#

H40		<i>Belostoma angustum</i>	MG066578	#
H41		<i>Belostoma angustum</i>	MG066579	#
H42		<i>Belostoma angustum</i>	MG066580	#
11	<i>flumineum</i>	<i>Belostoma lutarium</i>	CNCHA751-11	#
496		<i>Belostoma lutarium</i>	#	AY585749
21		<i>Belostoma flumineum</i>	MG405584	#
13		<i>Belostoma flumineum</i>	MG402399	#
20		<i>Belostoma flumineum</i>	MG400663	#
16		<i>Belostoma flumineum</i>	KT708568	#
8		<i>Belostoma flumineum</i>	KT708133	#
9		<i>Belostoma flumineum</i>	KT707889	#
10		<i>Belostoma flumineum</i>	KT707750	#
19		<i>Belostoma flumineum</i>	KT707393	#
17		<i>Belostoma flumineum</i>	KT707201	#
14		<i>Belostoma flumineum</i>	KT707013	#
18		<i>Belostoma flumineum</i>	KT706655	#
15		<i>Belostoma flumineum</i>	KT706646	#
11		<i>Belostoma flumineum</i>	KT706626	#
6		<i>Belostoma flumineum</i>	KR582577	#
1		<i>Belostoma flumineum</i>	KR043908	#
2		<i>Belostoma flumineum</i>	KR031084	#
7		<i>Belostoma flumineum</i>	KT705547	#
25		<i>Belostoma flumineum</i>	KY320475	#
45119		<i>Belostoma flumineum</i>	#	KY389132
S1		<i>Belostoma flumineum</i>	#	KY389121
S2		<i>Belostoma flumineum</i>	#	KY389127
5		<i>Belostoma flumineum</i>	BBHMA1101-12	#
4		<i>Belostoma flumineum</i>	BBHMA1103-12	#
24		<i>Belostoma flumineum</i>	CNCHA750-11	#
52		<i>Belostoma flumineum</i>	TTHFW029-08	#
3		<i>Belostoma flumineum</i>	BBHMA1100-12	#
23		<i>Belostoma flumineum</i>	BYRN033-13	#
27		<i>Belostoma flumineum</i>	SDP262011-14	#
28		<i>Belostoma flumineum</i>	SWABC1094-18	#
22		<i>Belostoma flumineum</i>	SWABC1095-18	#
29		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1857-18	#
30		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1859-18	#
31		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1860-18	#
32		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1861-18	#
33		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1863-18	#
34		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1866-18	#
35		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1867-18	#
36		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP1869-18	#
37		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP2103-18	#
38		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP2104-18	#
39		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP2106-18	#
40		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP2107-18	#
41		<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP863-18	#

42			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP864-18	#
12			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP865-18	#
43			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP866-18	#
44			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP867-18	#
46			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP868-18	#
45			<i>Belostoma flumineum</i>	SWBRP999-18	#
47			<i>Belostoma flumineum</i>	SWLNP513-18	#
48			<i>Belostoma flumineum</i>	SWLNP515-18	#
49			<i>Belostoma flumineum</i>	SWTHI671-17	#
50			<i>Belostoma flumineum</i>	SWTHI689-17	#
51			<i>Belostoma flumineum</i>	SWTHI690-17	#
26			<i>Belostoma flumineum</i>	SWTHI691-17	#
395	Moderately large to Large	<i>dentatum</i>	<i>Belostoma cummingsi</i>	KY320478	KY389115
142		<i>testaceopallidum</i>	<i>Belostoma ribeiroi</i>	KY320462	#
S1A			<i>Belostoma ribeiroi</i>	#	KY389103
S1B			<i>Belostoma ribeiroi</i>	#	KY389109
52	-	-	<i>Diplonychus rusticus</i>	HQ236475	FJ456940
7409	-	-	<i>Appasus major</i>	AB742803	AB743046

CAPÍTULO 2

Population structure of *Belostoma angustum* (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome

Artigo submetido na revista Invertebrate Biology. Fator de impacto: 1.250; Qualis na Biodiversidade:

B1

Normas de formatação:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/17447410/homepage/forauthors.html>

Population structure of *Belostoma angustum* Lauck (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome

Thaísa Bozzetti Gauterio¹, Fabiano Stefanello², José Ricardo Inacio Ribeiro³, Augusto Ferrari^{4,5},
Lizandra Jaqueline Robe^{1,4,6*},

¹Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Brazil.

² Laboratório de Biologia Comparada e Abelhas (LBCA), Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto (USP), Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Brazil.

³ Laboratório de Estudos da Biodiversidade do Pampa (LEBIP), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Brazil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Laboratório de Entomologia, Sistemática e Biogeografia – LESB, Brazil.

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Brazil.

⁶Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Brazil.

* lizbiogen@gmail.com

Short informative title: Population structure and expansion of a *Belostoma* species during Quaternary in Pampa Biome.

Short title: Population structure of *Belostoma angustum*.

ABSTRACT

Five evolutionary forces affect the genetic diversity of a population: mutation, migration or gene flow, recombination, genetic drift and natural selection. Nevertheless, climatic and geographic factors can preclude migration between populations resulting in intraspecific differentiation. *Belostoma angustum* encompasses an Hemiptera species that putatively presents high dispersal ability, migrating when environmental conditions are unstable or unfavorable. This species occurs along South-Southeast of South America, attaining the southern portion of the Andes, and occupying different geomorphological units and Köppen climate areas. Nevertheless, the impact of different topographic aspects in this distribution is not yet fully understood. Thus, the aim of this study was to evaluate the population structure presented by *B. angustum* across different geomorphological units located at the Brazilian Pampa Biome, especially between the Coastal Plain and the other more interior areas. For this, individuals belonging to populations distributed along Southern Brazil were sampled, morphologically identified and then characterized for two mitochondrial (COI and 16SrRNA) and one nuclear gene (ITS1). Individual and concatenated matrixes were assembled and used in phylogenetic, demographic and population structure analyses. Environmental Niche Models were also reconstructed to evaluate the potential distribution of the species in the present and in different moments of the past. Despite previous results suggesting the species encompasses a panmitic population in Southern Brazil, a significant population structure was recorded among populations located at the Coastal Plain and the other evaluated geomorphological units. Taken as a whole, Southern Brazil encompasses the area presenting the higher environmental suitability values across different moments of the past, although a considerable decrease in such values could be detected for most of the sampled region during the Last Glacial Maximum (LGM). Accordingly, signals of population expansion could be detected not only by the individual networks and neutrality tests, but also through an Extended Bayesian Skyline Plot. The higher diversity values recovered for the Coastal area allowed hypothesizing a recent expansion from the Coast to the more interior areas, suggesting that the panmictic population found for the last areas is resultant of recent colonization, and questioning the dispersal of *B. angustum* to disperse across long distances.

Keywords: Quaternary oscillation, migration, Coastal Plain of Rio Grande do Sul, population expansion.

1. INTRODUCTION

Five evolutionary forces affect the genetic diversity of a population: mutation, migration or gene flow, recombination, genetic drift, and natural selection. In isolated populations, mutation is the only source of new genetic variation (Griffiths et al., 2013). Different factors may influence the amount of gene flow between populations, including biological traits related to the size and vagility of each species (Dupuis et al., 2019), and its specific adaptations to different habitats (Hämälä & Savolainen, 2019). In this context, two other extrinsic factors may influence species subdivision: 1) climatic factors, that act globally establishing the limits of distribution of each species, according to its environmental tolerance, and promoting population expansions or retractions in virtue of climatic changes; and 2) geographic factors that act to facilitate or hinder the dispersion of populations (Zachos et al., 2001). Cladogenesis may occur after the persistent influence of the aforementioned factors (Zhao et al., 2020).

The Neotropical region harbors one of the highest biodiversity of the globe, encompassing seven of the major “hotspots” of biodiversity (Myers et al., 2000). Such a pattern is largely explained by the huge heterogeneity of climates (Antonelli, 2021) and biogeographic provinces presented by such region (Morrone, 2006), as well as by historical processes that seem to have promoted species diversification. In this context, different taxa seem to have diversified in association with paleogeographic or paleoclimatic events occurred during the Tertiary (between 65 and 1.8 million years ago) or Quaternary (from 1.8 million years ago) periods, respectively (Rull, 2008; Rull, 2011). In fact, the interplay between such events seems to have shaped the diversity and distribution of several Neotropical species (Turchetto-Zolet et al., 2017). Nevertheless, there are important gaps and biases in the distribution of the knowledge of such patterns among different

taxa and regions. In fact, only a small subset of published studies focused on invertebrates or freshwater species and temperate or subtropical areas (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Insects are a promising model to address the effect of short-range paleogeoclimatic differences, given their great diversity and ecological versatility, their abundance in different habitats and their short life cycle, with a greater number of generations per time interval. Among these, Heteroptera bugs are hemimetabolous insects, that can disperse both as a nymph and as an adult. Most of its species are terrestrial, but some are found in aquatic habitats. This is the case for bugs positioned in the Nepomorpha infraorder (Schuh, 1979). Among these water bugs, Belostomatid encompasses important large-bodied aquatic predators, that prey on insects (Consoli et al., 1989; Pereira et al., 1991), adult anurans (Hinshaw & Sullivan, 1990; Monte, 1945; Schuh & Slater, 1995) and small fish (Dimmock, 1887; Merritt & Cummins, 1996) and are considered important predators of medically important species of mosquitoes (Consoli et al., 1989). This family includes approximately 160 species, worldwide distributed, except for the Arctic regions and parts of the Palearctic, including much of Europe and northeast Asia (Lauck & Menke, 1961). These species may migrate by flying, walking and drifting, according to morphological or ethological properties (Phillipsen et al., 2015; Ohba, 2019).

Belostoma is a genus of Belostomatidae that comprises 68 species, of which 52 are found in Brazil (Moreira et al., 2011; Almeida et al., 2019). Lauck (1962, 1963, 1964) considered the differences between the shapes of dorsal arms of phallosoma and the ventral diverticulum as important criteria for separating 10 of the 16 established species groups. He also recognized that some species could comprise groups based on the body size of their members (Estévez & Polhemus 2001, 2007). *Belostoma angustum* Lauck, 1964 belongs to the *Belostoma bifoveolatum* Lauck, 1962 group, together with two other similar species: *B. bifoveolatum* (Spinola, 1852) and *Belostoma elegans* (Mayr, 1871). These are considered medium species, ranging from 21.5-24.5

mm according to Estévez & Polhemus (2001, 2007), that are cryptic in terms of body features and phallosome structural configuration. *Belostoma angustum* distribution comprises the South and Southeast of South America, including the southern portion of the Andes (Stefanello et al., 2018).

The life cycle of *B. angustum* is totally dependent on freshwater bodies, whether permanent or intermittent, both as a nymph or an adult insect. Although this species seems to present high flight capacity, there are no studies proving its dispersal across long distances. In this sense, it was previously hypothesized that different populations of *B. angustum* presented some level of genetic structure, according to the distance and connectivity among streams, ponds or lakes. Nevertheless, a fine-scale study conducted by Stefanello et al. (2019) demonstrated the presence of a panmitic population at different altitudes of the Pampa Biome, suggesting a stepping ponds dispersal mode and rejecting the influence of direct hydrological connectivity. As this work was a small-scale study, the application of such results to wider spatial sampling remains yet to be assigned, especially regarding different geomorphological units. Thus, the present study aims to test whether the results provided by Stefanello et al. (2019) apply in a further study considering a broader geographical area, including the coastal environment of Southern Brazil. This task was performed during assessment of the following questions: 1) Is there a significant population structure between coastal and interior areas of the Pampa Biome? 2) Which are the processes explaining current distribution of *B. angustum* in this area? Both these questions were answered with the help of molecular markers, that were evaluated under different approaches of genetics of populations, and distribution data, that were employed to perform Environmental Niche Modeling (ENM).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1.Study area

Samplings were performed in different streams, ponds or lakes located at the Pampa Biome of the Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. This region underwent geographic and climatic changes during the Tertiary and Quaternary periods, giving rise to a vast diversity of habitats. The vegetation of the Pampa Biome is composed of grasses and herbaceous plants, presenting a wide variety of permanent and temporary wet areas. This Biome constitutes 63% of the territory of Rio Grande do Sul, and 2% of the national territory (Instituto Brasileiro de Florestas, 2021). This is one of the most threatened Brazilian Biomes, being highly susceptible to conversions to cropland, grazing and exotic species forestry, and suffering specially with the consequences of overgrazing and sandification (Roesch et al., 2009).

The Pampa Biome encompasses four different geomorphological units: 1) Campanha Highland, that cover areas with 170-370 m of altitude and is influenced by granite, gneiss, siltstone and gondwanic sediments originating several types of soils; 2) Central Depression, that covers areas generally lower than 100m and represents the domain of Gondwanic sediments; 3) Sul-Rio-Grandense Highland, that covers areas with 350-400m of altitude, and is the oldest geological region of Rio Grande do Sul, taking part of the Granitic Shield (Boldrini, 1997) and 4) Coastal Plain of Rio Grande do Sul (CPRS), which is the youngest area of RS, consisting of a large sedimentary area that extends for 640 km from Torres to Barra do Chuí. The CPRS has a wide range of environments such as fields, swamps, lagoons, dunes, marshes and an extensive sandy beach. The formation of the CPRS began in the Tertiary, with formation of an alluvial fan system along the western edge of the plain. These sediments were reworked during the Quaternary through the influence of transgressive-regressive cycles resulting from sea level variations during the last

four glaciations, leading to the formation of four lagoon-barrier depositional systems, that occurred during the last 400,000 years. The first three were formed during the Pleistocene and the last, more recent, was formed during the Holocene, at about 5,000 years (Villwock & Tomazelli, 2007). The CPRS also encompasses a distinct Brazilian physiographic region, presenting a differentiated diversity composition (Roesch et al., 2009).

2.2.Population sampling

The specimens used in this study were collected at six sites distributed in different municipalities of CPRS (Figure 1, Supplementary Material - Table S1). Additional samples encompassing the other three geomorphological units of the Pampa Biome (Atlas Socioeconômico do RS, 2021), that is, the Sul-Rio-Grandense Highland, the Central Depression, and the Campanha Highland were obtained from Stefanello et al. (2019). The collections were carried out using sieves and “D” mesh and the collected individuals were stored in 100% ethanol and maintained in the laboratory at -20°C.

2.3.DNA Manipulation

DNA extraction was performed using Nucleo SpinTissue XS kit (MACHEREY-NAGEL). The mitochondrial genes were amplified using primers TYJ1460: 5’ TACAATCTATCGCCTAAACCTTCAGCC3’ (Simon et al., 1994) and HCO2198: 5’ TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3’ (Folmer et al., 1994), for Cytochrome C oxidase subunit I (COI); and LRK13417: 5’ CGCCTGTTTAACAAAAACAT 3’ (Simon et al. 1994) and LRJ12961: 5’ TTTAATCCAACATCGAGG 3’ (Cognato & Vogler, 2001) for 16SrRNA. The nuclear Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) was amplified using HemiptITS1_1717: 5’

ATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAA 3' and HemiptITS1_2609: 5' GCCGAGTGATCCVCCGYCAGGGT 3' (Stefanello et al., 2019). In each 20 µl reaction, 50-100 ng DNA was added to a mix containing 1 × buffer, 1 µM of each primer, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 0.5 U Taq DNA polymerase. COI amplification was performed by means of an initial stage of denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 55–57 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, and by a final extension cycle at 72 °C for 7 min. The same conditions were employed for 16S and ITS, except for the annealing temperature, which was set to 52.5 °C for 1 min. and 15 s and 58°C for 1 min., respectively. The amplicons were purified with a solution containing 7.5M ammonium acetate (C₂H₇NO₂) and then directly sequenced by MACROGEN (Seoul, South Korea) on a 3730XLs automated sequencer using the same PCR primers.

2.4.Sequence alignment, distance and phylogenetic analyses

First, new sequences had their identity confirmed by BLASTN (NCBI, 2021). All electropherograms were then inspected and assembled in Gap4 from the Staden package (Staden, 1996). Alignments were performed using ClustalW, as presented in Mega 7.0 (Tamura et al., 2013). Substitution models were individually assigned to each gene or concatenated matrix using the Akaike Information Criterion (AIC), under likelihood estimates obtained in jModelTest (2.1.7). Bayesian Inferences (BI) were conducted using individual and multi-loci matrixes, as implemented in MrBayes v. 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

2.5. Population diversity and genetic structure

Diversity and neutrality tests were performed in DNAsp software (6.12.3) where the values of haplotype diversity (H_d), number of haplotypes (H), nucleotide diversity (π), Tajima's D , Fu & Li's D and Fu's F_s were estimated. ITS alleles were reconstituted using PHASE 2.1 in DNAsp, and then employed in a recombination analysis. The relationships between haplotypes were inferred through the construction of haplotype networks by the median-joining algorithm in Network 5.0.1.1 software (Bandelt et al., 1999). F_{ST} values were calculated in Arlequin v. 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) to measure the genetic differentiation among populations or geomorphological regions. Pairwise F_{ST} among populations were later employed in a Mantel Test. An analysis of molecular variance (AMOVA) was implemented in the same software to calculate the percentage of genetic variation between and within groups or populations, with significance measured through 10,000 permutations. Results of Mantel and AMOVA were evaluated at a 5% significance level. A Spatial Analysis of Molecular Variance (SAMOVA) was also implemented to define groups of populations that are geographically homogeneous and genetically differentiated from each other, and to define other potential geographic barriers between groups. SAMOVA was performed for each of the three genes, for the concatenated mitochondrial genes (COI + 16S) and for the total dataset (COI + 16S + ITS1).

2.6. Molecular dating analysis

Dating estimates were calculated for *B. angustum* using the Bayesian MCMC method implemented in BEAST v2.4.8 (Bouckaert et al., 2014), with COI, 16S and ITS1 gene alignments. Unlinked TPM3uF+G, GTR+I+G and TVM models were applied to 16S, COI and ITS genes, respectively. Calibration priors were defined by three groups of uniform distributions applied to

the each of following monophyletic units: 1) *Abedus* + *Ranatra* + *Belostoma*, with divergence times ranging from 60 to 130 Mya; 2) *Gelastocoris* + *Megochterus* + *Nerthra*, representing the superfamily Ochteroidea, with a divergence time ranging from 199.6 to 228 Mya and 3) *Hypselosoma* + *Pateena*, representing Schizopteridae, with a divergence time ranging from 99.6 to 145.5 Mya. These divergence times were based on fossil calibration and taken from the study of Li et al. (2012). For all genes, a relaxed molecular clock was used under an uncorrelated log-normal model and a Coalescent Constant Population process, with unlinked site and clock models and linked trees. The MCMC analysis was run for 500,000,000 generations, sampling every 20,000 generations. Tracer 1.7.1 (Rambaut et al., 2018) was used to evaluate if ESS values were above 200, and if posterior and likelihood values converged after a burn-in of 10%. TreeAnnotator was used to build the final Maximum Clade Credibility Tree (MCCT) tree with limit values of posterior probability set to 0.7 and burn-in to 10%. FigTree 1.4.4 was used to visualize the final tree and assess divergence times and posterior probabilities (PP).

2.7. Demographic expansion

An Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) analysis was performed to infer potential demographic changes faced by *B. angustum* over time, as performed in BEAST 2.4.8 software (Bouckaert et al., 2014) under a relaxed molecular clock model. Nucleotide substitution models were chosen according to the AIC criterion, as measured by jModelTest 2.17 (Darriba et al., 2012). For the partitions, unlinked site and clock models and linked trees were implemented employing genealogical inference under a coalescent model, using substitution rates and standard deviations (ucld mean) calculated in the chronophylogenetic analysis. The analysis was performed with 500,000,000 generations, sampling every 20,000, with a burning of 10%. Tracer was used to

visualize ESS values and evaluate convergence. The EBSP graph was obtained using the EBSP.log file and the plotEBSP.R routine developed by Heled & Drummond (2008) on R 4.0.2 (R Development Core Team, 2020).

2.8.Environmental Niche Modeling

A total of 59 occurrence sites were compiled from the literature (Bachmann, 1999; Lauck, 1964; Lopes et al., 2019; Ribeiro et al., 2017; Stefanello et al., 2018, 2019) and added to the set of six registers obtained in this study (Figure 1). Bioclimatic terrestrial layers were downloaded for present and for three stages of the Quaternary (Last Glacial Maximum - LGM21; Last Interglacial Period - LIG130 and Marine Isotope Stage - MIS787), and the Pliocene (ca. 3.3 Mya) from PaleoClim (Brown et al., 2018) with a resolution of 2.5min. After, the layers were cut according to the shape of South America on QGis 3.10.10 (QGIS Development Team, 2009). Correlation analysis were then performed to remove highly correlated variables, using a threshold of $r < 0.7$. This led to the selection of the following climatic variables: bio3 - Isothermality, bio4 - Temperature Seasonality, bio7 - Annual Temperature Variation, bio14 - Rainfall of the Dryest Month, bio15 - Precipitation Seasonality, bio17 - Dryer Trimester Precipitation, bio18 - Warmer Trimester Precipitation and bio19 - Cooler Trimester Precipitation.

Seven algorithms were used on Environmental Niche Modeling (ENM) strategies, using packages sp (Pebesma & Bivand, 2005), raster (Hijmans & Etten, 2012) and dismo (Hijmans et al., 2015): Bioclim (Booth et al., 2013), Maxent (Phillips et al., 2006), Domain (Carpenter et al., 1993), Mahalanobis distance (Ibañez, 1981), GLM (Bolker, 2009), SVM (Drake et al., 2006) and Random Forest (Breiman, 2001), as implemented on R4.0.2 software. In each case, modeling was performed with 10 cross-validation replicates, in each of which 75% of the points were used as training and

25% as a test. The background was obtained within a radius of 500 km from the occurrence points. In the reconstruction of historical potential distributions, models were calibrated to the present, and then projected to the past. After the performance of each model was evaluated using the area under the curve (AUC) plots, Ensemble conjugated models were reconstructed to infer the potential geographic distribution of *B. angustum* at present, and at different moments of the past, to evaluate potential range shifts and expansions over time.

3. RESULTS

A total of 156 individuals of *B. angustum* sampled in 24 locations were included in the analyses. Of these, 48 individuals were sampled along five municipalities of the CPRS: Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Terra de Areia, São José do Norte and Mostardas. Among the other 108 individuals, 36 were collected in each one the Sul-Rio-Grandense Highland (Barão do Triunfo, Encruzilhada do Sul, Canguçu, Pinheiro Machado, Bagé and Caçapava do Sul), the Central Depression (São Gabriel, Rosário do Sul, Dom Pedrito and Santana do Livramento) and the Campanha Highland (Rosário do Sul, Santana do Livramento and Quaraí) (Table S1). Since Stefanello et al. (2019) evidenced the absence of genetic structure among populations of *B. angustum* collected across the last three geomorphological units of the Pampa Biome, most genetic comparisons were performed considering two population groups: the CPRS versus the other three geomorphological units (hereafter called “interior geomorphological units” or “others”). In total 140, 85 and 108 sequences were employed for the COI, 16SrRNA and ITS1 genes, respectively. For the concatenated analyses, 78 and 135 sequences were included for the concatenated mitochondrial genes and for the total data matrix, respectively. These two matrices were

constructed including all species that have sequences for both mitochondrial markers, and that have sequences for at least two of the three markers, respectively.

3.1. Phylogenetic analysis and temporal diversification

Phylogenetic trees resulting from different individual and concatenated analysis retrieved *B. angustum* as a highly polytomic monophyletic lineage (Supplementary material, Figures S1-S5). In fact, no resulting tree recovered the CPRS or the other three geomorphological units as reciprocally monophyletic clades. The chronophylogenetic tree (Figure 2) generated for the multi-locus dataset using three fossil calibrations showed a similar polytomic topology, suggesting that *B. angustum* diversified in the sampling area during late Tertiary or early Quaternary (8.6 Mya – range from 3.9 to 13.3 Mya).

3.2. Population diversity and genetic structure

Analyses of diversity and neutrality were performed for the whole species and separating populations in Coastal vs. others, for each of the individual genes and the two concatenated matrix (mitochondrial and total data). The total number of haplotypes for each partition varied from 29 (for COI) to 15 (for 16S). Haplotype diversities were generally higher for the CPRS (0.641, 0.813 and 0.682, as estimated with COI, 16S and ITS sequences, respectively) than for the other three geomorphological units taken as a whole (0.446, 0.00 and 0.363, as estimated with COI, 16S and ITS sequences, respectively). Nucleotide diversities did not exceed 0.00513 (for 16S) and 0.00167 (for the concatenated dataset) for the CPRS and the interior geomorphological units, respectively. Neutrality tests indicated a strong sign of population expansion, with most Tajima's *D* values

negative and significant for each data set, but specially for the species taken as a whole or even interior geomorphological units (Table 1).

When F_{ST} analyses were performed between CPRS and the other geomorphological units, all comparisons showed significant results, evidencing the presence of population structure among specimens from the Coastal Plain and from other regions (Table 2). In these cases, F_{ST} values ranged from 0.0132 (for COI), to 0.4022 (for the concatenated mitochondrial dataset). Even so, AMOVA demonstrated that genetic differences are mainly explained by variation within populations (Tables S2-S6). In fact, the percentage of the genetic variation explained by variation within populations ranged from 48.38% (considering the concatenated matrix) to 93.16% (considering only COI). Interestingly, most results of SAMOVA revealed a population subdivision in at least two groups: one containing the Coastal Senandes population and the other containing the remaining populations. Such a structure, explained 63.21%, 56%, 56.72% and 53.23% of the variation for COI, 16S, the concatenated mitochondrial matrix and the total dataset, respectively. Nevertheless, ITS suggested a distinct structure, separating one of the populations of Santana do Livramento from the remaining populations. The Mantel test showed a correlation coefficient of $r=-0.035997$ ($p=0.475300$), -0.013628 ($p=0.612500$) and -0.183537 ($p=0.954600$) for the COI, 16S and ITS genes, respectively. These non-significant results suggest that there is no correlation between genetic distances and geographic distances between clades.

Finally, results of the networks generally recovered a starlike pattern, especially for COI and ITS. Within this context, 16S also suggested the presence of a shallow subdivision between Coastal and interior areas, recovering a single haplotype for all individuals of the three interior geomorphological units, which is also shared with the CPRS, and 14 exclusive haplotypes for the last area (Figure 3A). ITS also presented an excess of exclusive sequences, with only one allele shared between Coastal and interior areas (Figure 3B). A similar pattern was recovered for COI,

with 23 of the 29 haplotypes revealing exclusive (six to the CPRS and 17 from the interior geomorphological units) (Figure 3C).

3.3.Demographic expansion

When we consider the entire *B. angustum* dataset, most of the Tajima's *D*, Fu & Li's *D* and Fu's *F_s* neutrality tests values resulted in negative and significant values (except for Fu & Li's *D* related to ITS) (Table 1). This result indicates a population expansion over time, which is also suggested by the “star-like” pattern presented by the networks. The EBSP analysis performed with the three evaluated loci (Figure 4) also provided evidence for a population growth after a prolonged phase of demographic stability, that is estimated to have started about 1,000,000-20,000 years ago.

3.4.Environmental Niche Modeling

Mean AUC values considering the 10 replication runs evaluated for the models reconstructed by Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis, GLM and SVM ranged from 0.94982 to 0.80145 (Table 3) indicating consistent high overall performance for the models. According to the ENM recovered for *B. angustum* in the five periods (Pliocene, MIS 787, LIG 130, LGM 21 and present - Figures 5, 6, 7, 8 and 9, respectively) Southern Brazil encompasses the area presenting the higher environmental suitability values. Interestingly, projections for the Pliocene and for the MIS and LIG interglacial periods suggest areas of maximum suitability that are larger and more continuous than those presented by the last glacial period (LGM), characterized as a cooler and drier period. The current distribution suggests a fragmentation of the areas of maximum suitability, especially between the Andean and other South-American populations.

4. DISCUSSION

Although previous results suggested the presence of a panmitic population of *B. angustum* in different geomorphological units encompassing the interior part of the Pampa Biome (Stefanello et al., 2019), a significant population structure could be detected here between these and the PCRS. In fact, although values of F_{ST} between interior and Coastal areas varied among the three employed markers, all comparisons resulted in significant differences, and 16S evidenced the presence of a shallow structure on the Network analysis. Such a differentiation can result from differences in altitude between interior and Coastal regions, suggesting that topography represents a putative geographic barrier for *B. angustum*, limiting its dispersal capacity. Nevertheless, the demographic history of the species may also have been determinant to these observations.

In this sense, fluctuations in population sizes and expansions in different moments of the past may also afford for the observed patterns of genetic structure and are in accordance with other results provided here. In fact, all the networks highlighted the predominance of exclusive alleles, and a star-like pattern could be evidenced for most markers suggesting the species underwent a recent population expansion. These results, in combination with the neutrality tests, the EBSP, the chronophylogeny and the ENM techniques reinforced the hypothesis previously proposed by Stefanello et al. (2019) that these populations have undergone a spatial expansion over time. Nevertheless, disentangling the effects of geography versus history on the observed patterns of genetic structure remains a challenging task.

4.1. Demographic history of *B. angustum* in face of the evolution of the PCRS topography

According to the scenario recovered here, *B. angustum* diversified in Southern Brazil about 8 Mya (8.6 Mya – range from 3.9 to 13.3 Mya). Thus, during its first diversification, in latter

Miocene and early Pliocene, the target species seems to have faced some climate, vegetation and hydrologic parameters that are very similar to current days. Nevertheless, during Pleistocene, it may have been affected not only by the historical climatic oscillations, but also by the effects of marine regressions and transgressions that affected at least part of its distribution area during recent past (Villwock & Tomazelli, 2007). In fact, during glacial periods of the Pleistocene, climate became drier and colder, causing a reduction of tropical forests that began to become grasslands and savanas (Polly, 1994) and a regression of marine levels (Iriarte et al., 2020). Conversely, during interglacial periods, as MIS and LIG, climate became wet and warm, and wetlands were represented by extensive portions of water, that occurred in association with marine transgressions (Past Interglacials Working Group of PAGES, 2016). As a species strictly related to freshwater bodies, that depends on precipitation and humidity, *B. angustum* may have retracted and expanded its population sizes in association with the Quaternary climatic oscillations.

In fact, results provided by ENM showed that the extent of areas with high suitability values for *B. angustum* during MIS and LIG was large. Nevertheless, this area was highly reduced during the LGM. Taken together, ENM and EBSF enabled to establish the end of the LGM as the putative trigger of the coast to interior spatial expansion of *B. angustum*. This expansion after the LGM may have occurred not only due to the enrichment of areas with higher suitability values for target species, but also due to the increase in voltinism which, consequently, leads to the synchronism of hatches and the increase in population of insect species (Kiritani, 2006).

Concerning the geographical patterns, as the Coastal region generally presented the highest diversity values, and part of this region seems to have presented the environmental requirements for the survival of the species during this period, we hypothesize a Coastal to Interior colonization. Moreover, as the SAMOVA results presented a Coastal population (Senandes) as highly differentiated from the other, it is possible to speculate that this area provided a refuge for the

species during the dry glacial period. The hydrology of this area, largely fragmented into small wetlands (Villwock & Tomazelli, 2007), possibly enabled the persistence of the species even during harsh times. Afterwards, when climatic condition became more suitable, the high flying capacity of *B. angustum* (Ribeiro, personal communication) may have prompted the dispersion to previously unoccupied areas. These new habitats possibly comprised not only the interior of the Pampa Biome, but also some Coastal areas that were also established during the last 5 thousands of years (Villwock & Tomazelli, 2007). Also, in accordance with this, the Senandes population is located on an area that is among the most ancient areas of the PCRS.

5. CONCLUSION

Taken as a whole, the results provided here seem to reflect a generalized gene flow model that established after a recent and rapid spatial expansion. This expansion seems to have started during the late Pleistocene, after the LGM, due to increased temperature and humidity and, consequently, due to increased availability of aquatic environments in optimal environmental conditions and with availability of food resources. Nevertheless, migration-drift equilibrium that may have been reached after this first expansion did not attain a totally panmitic population in the Pampa Biome. Conversely, the species seems to comprise different population clusters, within which panmixia may apply. This was the case, for example, for the interior geomorphological units taken as a whole, as well as for part of the PCRS (to the exception of the Senandes population). Within these areas, the lack of structure encountered in some areas can be explained by the stepping ponds system that facilitates gene flow between populations (Stefanello et al., 2019). After all, although we provided some evidence that this model does not apply at further distances, we were not able to discard two of its most important properties: 1) the absence of a pattern of isolation by

distance; and 2) the low influence of hydrological connectivity in the levels of gene flow among populations. Thus, although we showed here that there the migration-drift equilibrium reached a status.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Universal-CNPq/2014 (process number 447259/2014-8). T.B.G. received a research grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES (Finance Code 001) and LJR is a research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (308371/2018-6).

7. REFERENCES

- Almeida, T. M., Stefanello, F., Hamada, N. (2019). Belostomatidae (Heteroptera: Nepomorpha) held in the Invertebrate Collection of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil: inventory and new distributional records. *Papéis Avulsos De Zoologia*, 59, e20195906, 1-23. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2019.59.06>.
- Antonelli, A. (2021). The rise and fall of Neotropical biodiversity. *Botanical Journal of the Linnean Society*,
- Atlas Socioeconômico do RS. (2021). Hipsometria e Unidades Geomorfológicas. Available at: <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/hipsometria-e-unidades-geomorfologicas>. Accessed in: 03/11/2021.
- Bachmann, A. O. (1999). Catálogo de los tipos de Heteroptera (Insecta) conservados en el Museo Argentino de Ciencias Naturales. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 1(2), 191 - 230.

- Bandelt, H. J., Forster, P. Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Boldrini, I. I. (1997). Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática Ocupacional. *Boletim do Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(3), 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008>.
- Booth, T. H., Nix, H. A., Busby, J. R., Hutchinson, M. F. (2013). BIOCLIM: the first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MAXENT studies. *Diversity and Distributions*, 20, 1-9.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., Suchard, MA., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4). doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine learning*, 45(1), 5-32.
- Brown, J. L., Hill, D. J., Dolan, A. M., Carnaval, A. C., Haywood, A. M. (2018). PaleoClim, high spatial resolution paleoclimate surfaces for global land areas. *Scientific Data*. 5. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.254>
- Carpenter, G., Gillison, A. N., Winter, J. DOMAIN: a flexible modelling procedure for mapping potential distributions of plants and animals. (1993). *Biodiversity and Conservation*, 2, 667–680. <https://doi.org/10.1007/BF00051966>
- Cognato, A. I., Vogler, A. P. (2001). Exploring data interaction and nucleotide alignment in a multiple gene analysis of *Ips* (Coleoptera: Scolytinae). *Systematic Biology*, 50, 758–780.

- Consoli, R. A. G. B., Pereira, M. H., Melo, A. L. & Pereira, L.H. (1989). *Belostoma micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 577-578.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- Dimmock, G. (1887). Belostomidae and other fish-destroying bugs. *Zoologist*, 11, 101-105.
- Drake, J., Randin, C., Guisan, A. (2006). Modelling ecological niches with support vector machines. *Journal of Applied Ecology*, 43, 424-432. 10.1111/j.1365-2664.2006.01141.x.
- Dupuis, J. R., Cullingham, C. I., Nielsen, S. E., Sperling, F. A. H. (2019). Environmental effects on gene flow in a species complex of vagile, hilltopping butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 127(2), 417–428.
- Dupuis, J. R., Cullingham, C. I., Nielsen, S. E., Sperling, F. A. H. (2019). Environmental effects on gene flow in a species complex of vagile, hilltopping butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 127(2), 417–428.
- Estévez, A. L., Polhemus, J. T. (2001). The small species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). 1.Key to species groups and a revision of the *denticolle* group. *Iheringia*, 91, 151–158. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000200021>
- Estévez, A. L., Polhemus, J. T. (2001). The small species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). 1.Key to species groups and a revision of the *denticolle* group. *Iheringia*, 91, 151–158. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000200021>

Estévez, A. L., Polhemus, J. T. (2007). The small species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae): revision of the *plebejum* group. *Revista de Biología Tropical*, 55, 147–155.

Estévez, A. L., Polhemus, J. T. (2007). The small species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae): revision of the *plebejum* group. *Revista de Biología Tropical*, 55, 147–155.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., Doebley, J. (2013). *Introdução à Genética*. Guanabara Koogan.

Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., Doebley, J. (2013). *Introdução à Genética*. Guanabara Koogan.

Hämälä, T., Savolainen, O. (2019). Genomic Patterns of Local Adaptation under Gene Flow in *Arabidopsis lyrata*. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11), 2557–2571.

- Hämälä, T., Savolainen, O. (2019). Genomic Patterns of Local Adaptation under Gene Flow in *Arabidopsis lyrata*. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11), 2557–2571.
- Heled, J., Drummond, A. J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Ecology and Evolution*, 8. 10.1186/1471- 2148-8-289.
- Heled, J., Drummond, A. J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Ecology and Evolution*, 8. 10.1186/1471- 2148-8-289.
- Hijmans, R. J., van Etten, J. (2012). raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 2.0-12. <http://CRAN.R-project.org/package=raster>
- Hijmans, R. J., van Etten, J. (2012). raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 2.0-12. <http://CRAN.R-project.org/package=raster>
- Hijmans, R. J., Phillips, S., Leathwick, J., Elith, J. (2015) Dismo: Species Distribution Modeling. R Package Version 1.0-12. <http://CRAN.R-project.org/package=dismo>
- Hijmans, R. J., Phillips, S., Leathwick, J., Elith, J. (2015) Dismo: Species Distribution Modeling. R Package Version 1.0-12. <http://CRAN.R-project.org/package=dismo>
- Hinshaw, S. H., Sullivan, B. K. (1990). Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer* during reproduction. *Journal of Herpetology*, 24, 196-197.
- Hinshaw, S. H., Sullivan, B. K. (1990). Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer* during reproduction. *Journal of Herpetology*, 24, 196-197.
- Li, M., Tian, Y., Zhao, Y., Bu, W. (2012). Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. *PLoS ONE*, 7(2), e32152. doi:10.1371/journal.pone.0032152

- Lopes, C. F., Stefanello, F., Bugs, C., Stenert, C., Maltchik, L., Ribeiro, J. R. I. (2019). Sexual dimorphism in *Belostoma angustum* Lauck (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae) may be related to paternal care. *Biological Journal of the Linnean Society*, 20, 1–27.
- Mayr, G. (1871). Die Belostomiden. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, 21, 399-440.
- Merritt, R. W., Cummins, K. W. (1996). *An introduction to the aquatic insects of North America*. Kendal/Hunt Publishing Company.
- Monte, O. (1945). Baratas d'água (especial). *Chácaras Quint*, 71, 454-458.
- Moreira, F. F. F., Barbosa, J. F., Ribeiro, J. R. I., Alecrim, V. P. (2011). Checklist and distribution of semiaquatic and aquatic Heteroptera (Gerromorpha and Nepomorpha) occurring in Brazil. *Zootaxa*, 2958, 1-74.
- Morrone, J. J. (2006). Biogeographic áreas and transitions zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51, 467-494.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- National Center for Biotechnology Information. (2021). The National Center for Biotechnology Information. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed in: 5/15/21.
- Ohba, S. (2019). Ecology of giant water bugs (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae). *Entomological Science*, 22, 6-20.
- Osawa, T., Yamasaki, K., Tabuchi, K., Yoshioka, A., Ishigooka, Y., Sudo, S., Takada, M. B. (2018). Climate-mediated population dynamics enhance distribution range expansion in a rice pest insect. *Basic and Applied Ecology*, 30, 41–51.

Past Interglacials Working Group of PAGES. (2016). Interglacials of the last 800,00 years. *Reviews of Geophysics*, 54, 162-219. doi: 10.1002/2015RG000482.

Pebesma, E., Bivand, R. (2005). *S Classes and Methods for Spatial Data: the sp Package*.

Pereira, M. H., Melo, A. L., Pereira, L. H. (1991). Laboratory rearing of *Belostoma micantulum* Stål, 1858 (Hemiptera, Belostomatidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 53, 603-606.

Phillips, S. J.; Anderson, R. P., Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190 (3-4), 231–259.

Phillipsen, I. C., Kirk, E. H., Bogan, M. T., Mims, M. C., Olden, J. D., Lytle, D. A. (2015). Dispersal ability and habitat requirements determine landscape-level genetic patterns in desert aquatic insects. *Molecular Ecology*, 24 (1), 54-69. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.13003>

QGIS Development Team. (2009). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. Available at: <http://qgis.org>

R Development Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Version 4.0.2. Available at: <https://www.Rproject.org/>.

Rambaut A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67 (5), 901-904. doi:10.1093/sysbio/syy032

Ribeiro, J. R. I., Estévez, A. L., Moreira, F. F. F., Guilbert, E. (2017). Revision of the *Belostoma dentatum* group *sensu* Nieser (Insecta, Heteroptera, Belostomatidae). *Zootaxa*, 4276, 177-203.

Roesch, L. F. W., Vieira, F. C. B., Pereira, V. A., Schunemann, A. L., Teixeira, I. F., Senna, A. J. T., Stefanon, V. M. (2009). *Diversity*, 1(2), 182-198.

Rull, V. (2008). Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*. 17, 2722-2729.

- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 26, 508-513.
- Schuh, R. T. (1979). Evolutionary trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. *Systematic Zoology*, 28(4), 653-656.
- Schuh, R. T., Slater, J. A. (1995). *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*. Cornell University Press.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233-241.
- Stefanello, F., Bugs, C., Stenert, C., Maltchik, L., Guilbert, E., Ribeiro, J. R. I. (2018). Integration and modularity in the male genitalia and parameres of *Belostoma* species of *bifoveolatum* group sensu Lauck, 1962 (Insecta, Heteroptera, Belostomatidae). *Zoologischer Anzeiger*, 272, 45–64.
- Stefanello, F., Menezes, R. S. T., Ribeiro, J. R. I., Almeida, E. A. B. (2019). Widespread Gene Flow Model Explains the Genetic–Morphological Variation in a Giant Water Bug Species Under Fine-Scale Spatial Sampling. *Annals of the Entomological Society of America*, 20(10), 1–11. doi: 10.1093/aesa/saz063
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Turchetto-Zolet, A. C., Turchetto, C., Zanella, C. M., Passaia, G. (2017). Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética.
- Villwock, J. A., Tomazelli, L. J. (2007). Planície Costeira do Rio Grande do Sul: gênese e paisagem atual. Em: Becker, F. G., Ramos, R. A., Moura, L. A. (2007). Biodiversidade. Regiões da Lagoa

do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente.

Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292, 686–693.

Zhang, L., Cai, W., Luo, J., Zhang, S., Li, W., Wang, C., Lv, L., Cui, J. (2017). Population genetic structure and expansion patterns of the cotton pest *Adelphocoris fasciaticollis*. *Journal of Pest Science*, 91, 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0939-8>

Zhao, Z., Heideman, N., Bester, P., Jordaan, A., Hofmeyr, M. D. (2020). Climatic and topographic changes since the Miocene influenced the diversification and biogeography of the tent tortoise (*Psammobates tentorius*) species complex in Southern Africa. *BMC Evolutionary Biology*, 20, 153.

Illustrations:

Tables

Table 1. Summary statistics of genetic diversity and neutrality tests performed for all evaluated specimens of *B. angustum*, or for specimens collected at the Coast or Interior areas of the Pampa Biome, based on individual markers (16S, COI or ITS), the concatenated mitochondrial dataset (16S + COI) and the concatenated multi-loci dataset (16S + COI + ITS). Significant values are reported in bold.

Region	Gene	H	k	Hd	π	Tajima's D	Fu & Li's D	Fu & Li's F	Fu's Fs
Coastal Plain	COI	29	0.84388	0.509 ±	0.00139 ±	-2.50071 (P < 0.001)	-4.71127 (P < 0.02)	-4.58285 (P < 0.02)	-41.263
				0.439 ±	0.00226 ±	-2.00518 (P < 0.05)	-4.38344 (P < 0.02)	-4.17580 (P < 0.02)	-14.413
	16S	15	0.5952	0.046	0.00033	-2.24515 (P < 0.01)	-1.73131 (P > 0.10)	-2.33043 (P < 0.05)	-18.099
				0.382 ±	0.00067 ±	-2.21837 (P < 0.01)	-0.78747 (P > 0.10)	-1.66945 (P > 0.10)	-44.046
	ITS	17	0.56817	0.042	0.00010	-1.95014 (P < 0.05)	0.26027 (P > 0.10)	-0.76595 (P > 0.10)	-32.406
				0.793 ±	0.00215 ±	-2.06491 (P < 0.05)	-2.15161 (P > 0.05)	-2.50445 (P < 0.05)	-8.241
	FCC (COI + 16S)	40	188.428	0.033	0.00019	-1.69471 (P > 0.05)	-3.32333 (P < 0.05)	-3.26935 (P < 0.02)	-9.517
				0.958 ±	0.00198 ±	-1.77787 (P < 0.05)	-1.96749 (P > 0.05)	-2.17745 (P > 0.05)	-2.174
	FCC (COI + 16S + ITS)	40	343.279	0.010	0.00014	-1.74298 (P > 0.05)	-0.90577 (P > 0.10)	-1.43665 (P > 0.10)	-24.412
				0.641 ±	0.00182 ±	-0.59131 (P > 0.10)	-0.66092 (P > 0.10)	-0.72513 (P > 0.10)	-3.634
	COI - Litoral	12	110.569	0.084	0.00034	-2.50911 (P < 0.001)	-4.78773 (P < 0.02)	-4.68786 (P < 0.02)	-31.839
				0.813 ±	0.00513 ± 0.00058	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	16S - Litoral	15	134.921	0.030	0.00174 ±	-1.89525 (P < 0.05)	1.48034 (P > 0.05)	0.25783 (P > 0.10)	-10.008
				0.682 ±	0.00076	-2.00206 (P < 0.05)	1.71129 (P < 0.02)	0.38612 (P > 0.10)	-9.649
Others	ITS - Litoral	6	14.697	0.148	0.00076	-1.83775 (P < 0.05)	2.01987 (P < 0.02)	0.60307 (P > 0.10)	-21.76
				0.964 ±	0.00354 ±				
	FCC (COI + 16S)	29	309.644	0.012	0.00031				
				0.978 ±	0.00285 ±				
	FCC (COI + 16S + ITS)	9	493.333	0.054	0.00053				
				0.446 ±	0.00120 ±				
Others	COI - Serra	23	0.72649	0.065	0.00023				
				0.363 ±	0.00061 ±				
	16 - Serra	0	0,00000	0,00000	0,00000				
				0.00000	0,00000				
	ITS - Serra	12	0.51251	0.043	0.00009				
				0.617 ±	0.00126 ±				
Others	FCC (COI + 16S)	15	11.027	0.054	0.00018				
				0.949 ±	0.00167 ±				
Others	FCC (COI + 16S + ITS)	31	288.996	0.012	0.00011				
				0.012	0.00011				

Table 2. Pairwise FST values estimated between specimens of *B. angustum* collected at Coastal and Interior areas of the Pampa Biome, based on individual markers (16S, COI or ITS), the concatenated mitochondrial dataset (16S + COI) and the concatenated multi-loci dataset (16S + COI + ITS). All values were significant.

Matrix	Population pairwise FSTs	P-value
COI	0.01316	0.03406+-0.0019
16S	0.27193	0.00000+-0.0000
ITS	0.09842	0.01069+-0.0009
FCC	0.40220	0.00000+-0.0000
FCC (mits)	0.10482	0.00000+-0.0000

Table 3. Mean test AUC values for the 10 replicate runs and the standard deviation for each of the models used (except Random Forest).

Models	Bioclim	Maxent	Domain	Mahal	GLM	SVM
AUC values	0.851163	0.949823	0.891457	0.865077	0.91071	0.80145
D.P	0.139435	0.379021	0.577633	-284.467	- 532.419	0.006444

Figure legends:

Figure 1. Map showing the distribution of *Belostoma angustum* on South America. New registers obtained for the Coastal Region in this study are depicted in blue; registers previously reported by Stefanello et al. (2019) for the interior geomorphological units of the Pampa Biome are represented in yellow; other registers are represented in black. The area of Brazil, Uruguay, Argentina and Bolivia appear in yellow, green, pink and blue, respectively.

Figure 2. Chronophylogenetic tree obtained with the multi-locus dataset (the mitochondrial COI and 16S genes, and the nuclear ITS marker). Values above and below (in bold) internal nodes refer to the mean divergence dating and posterior probability of each clade, respectively. Bars represent the 95% highest posterior density interval (HPD) for the divergence dating.

Figure 3. Genealogical relationships recovered among haplotypes or alleles samples at Coastal and Interior Pampas for (a) 16S; (b) ITS; (c) COI. Mutational steps are represented by dashes, and the diameter of the circles is proportional to the number of individuals presenting each sequence.

Figure 4. Graph of the variation in the effective population size (N_e) inferred for *B. angustum* over time. The dashed black line represents the average variation in N_e over time, whose 95% confidence intervals (CPD) are delimited in gray. Time is referred as Mya.

Figure 5. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for *B. angustum* at Late Pliocene.

Figure 6. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for *B. angustum* at the Marine Isotope Stage 19 (MIS, c. 787 ka).

Figure 7. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for *B. angustum* at the Last Interglacial Period (LIG, c. 120-140 ka).

Figure 8. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for *B. angustum* at (a) the Last Glacial Maximum (LGM, c. 21 ka).

Figure 9. Ensemble conjugated environmental suitability models predicted using Bioclim, Maxent, Domain, Mahalanobis distance, GLM, SVM and Random Forest for *B. angustum* at the present.

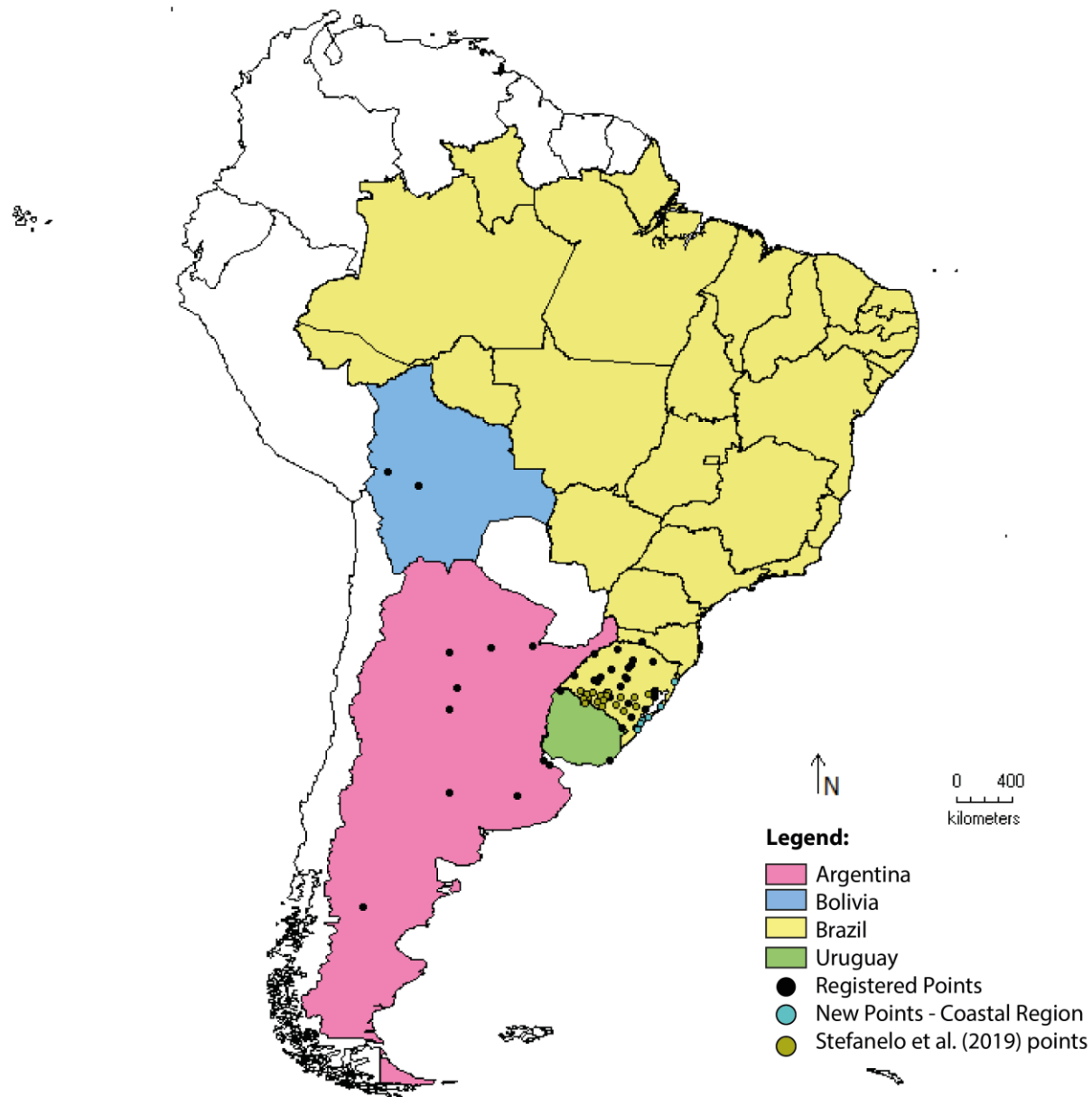


Figure 1.

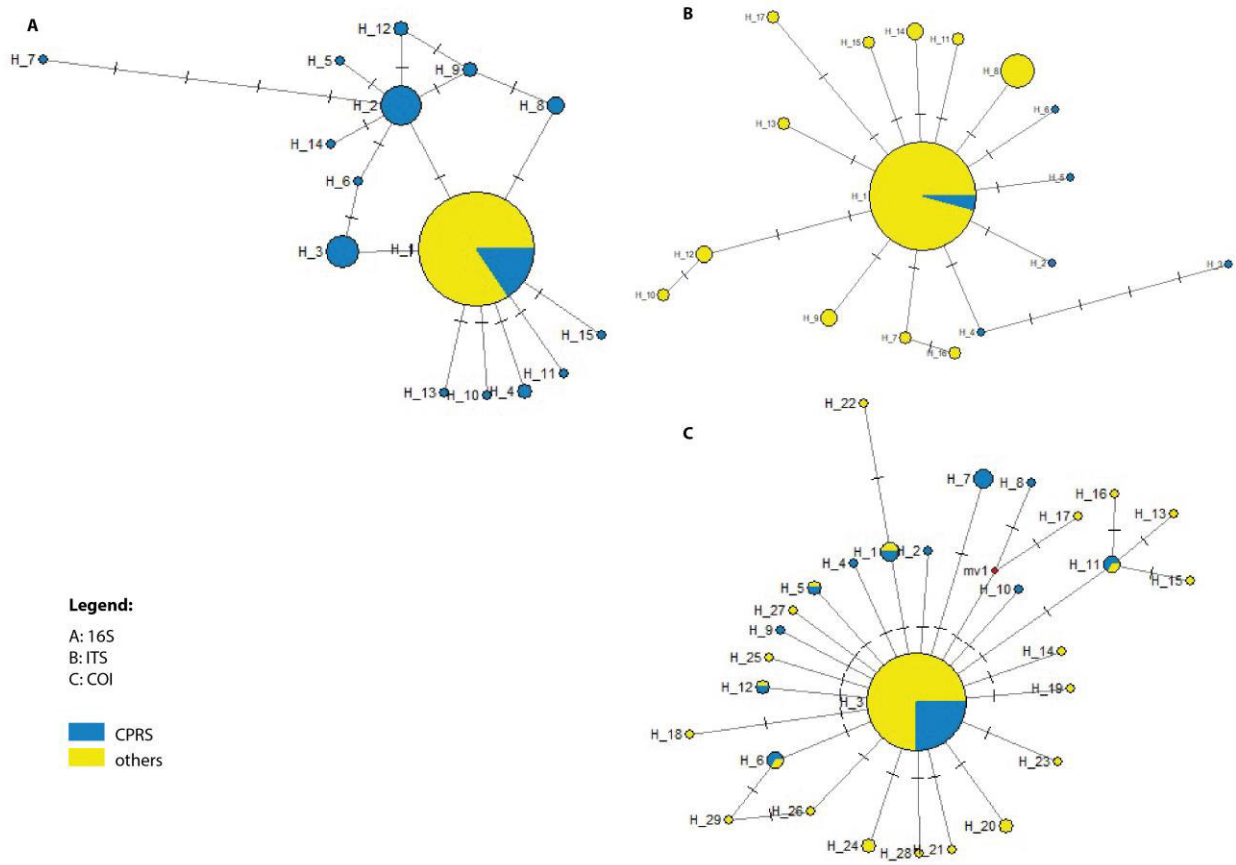


Figure 3.

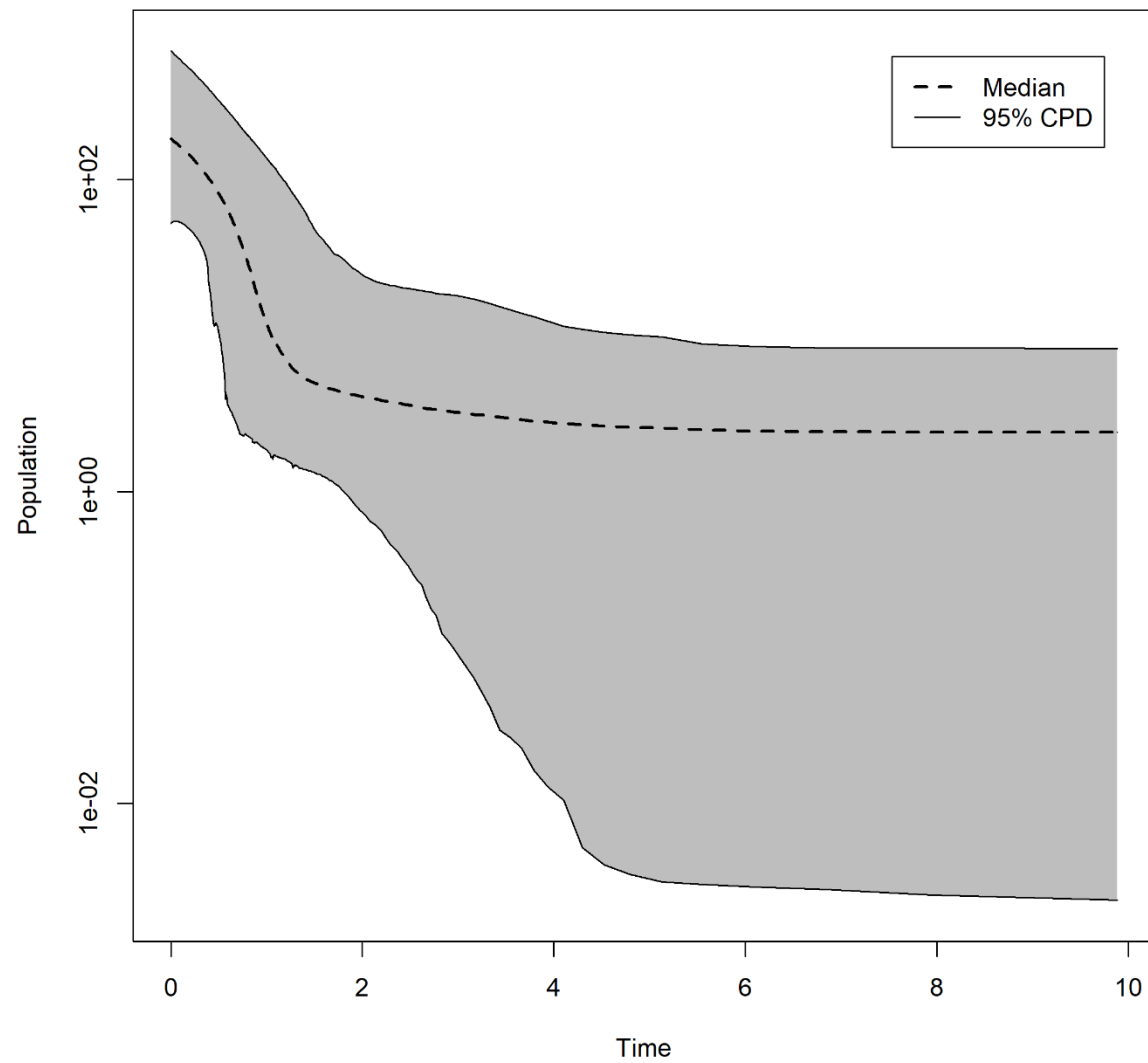


Figure 4.

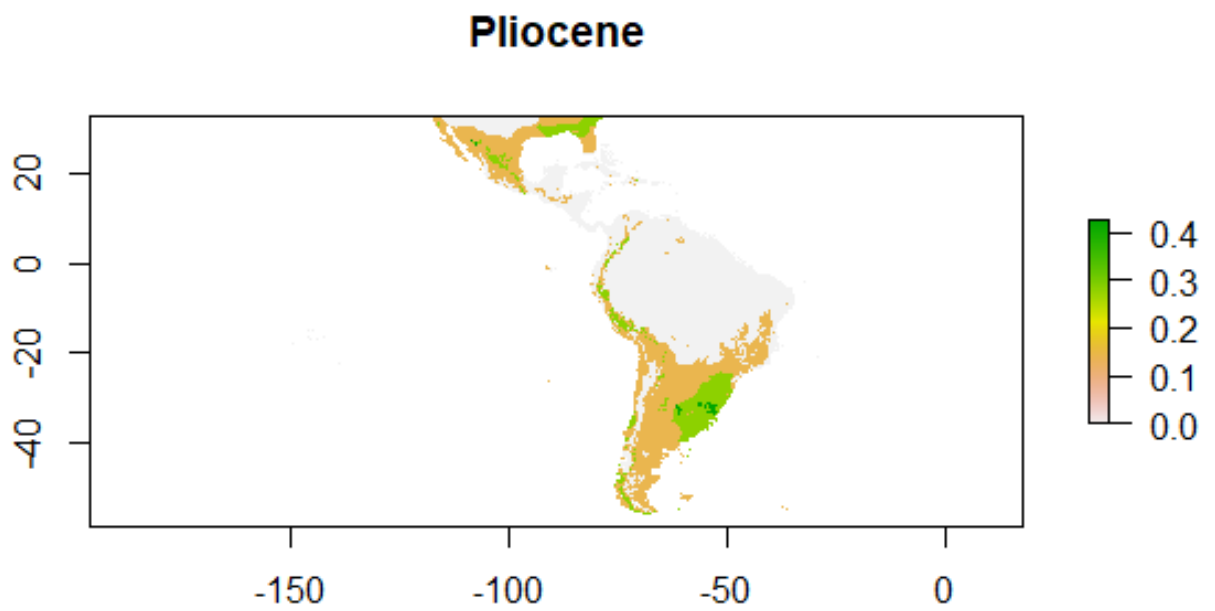


Figure 5.

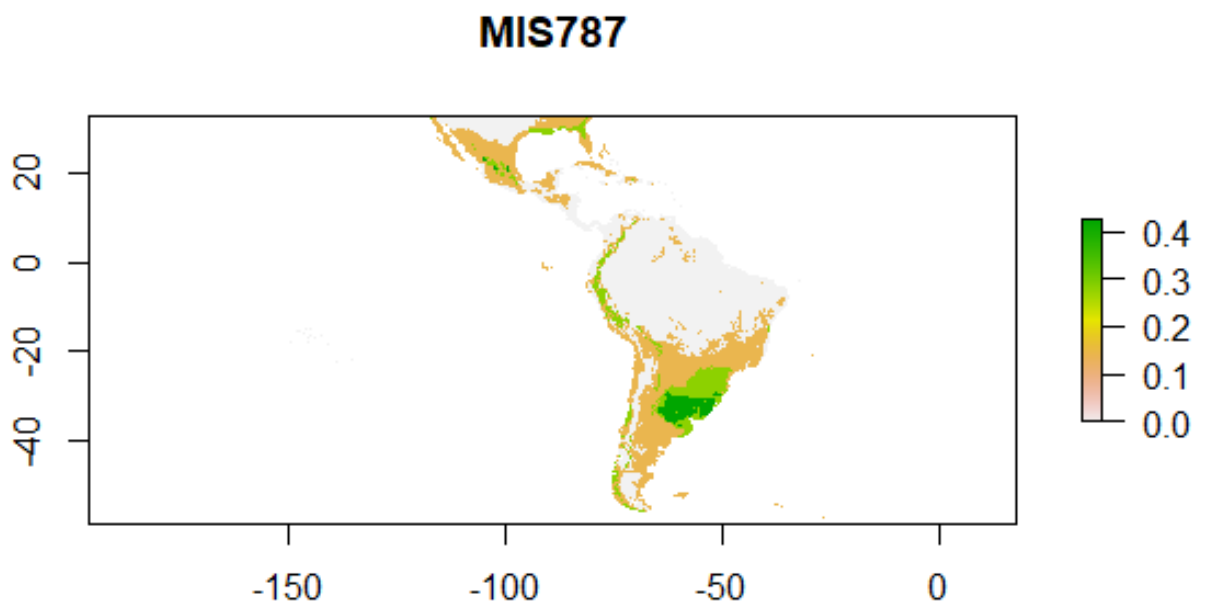


Figure 6.

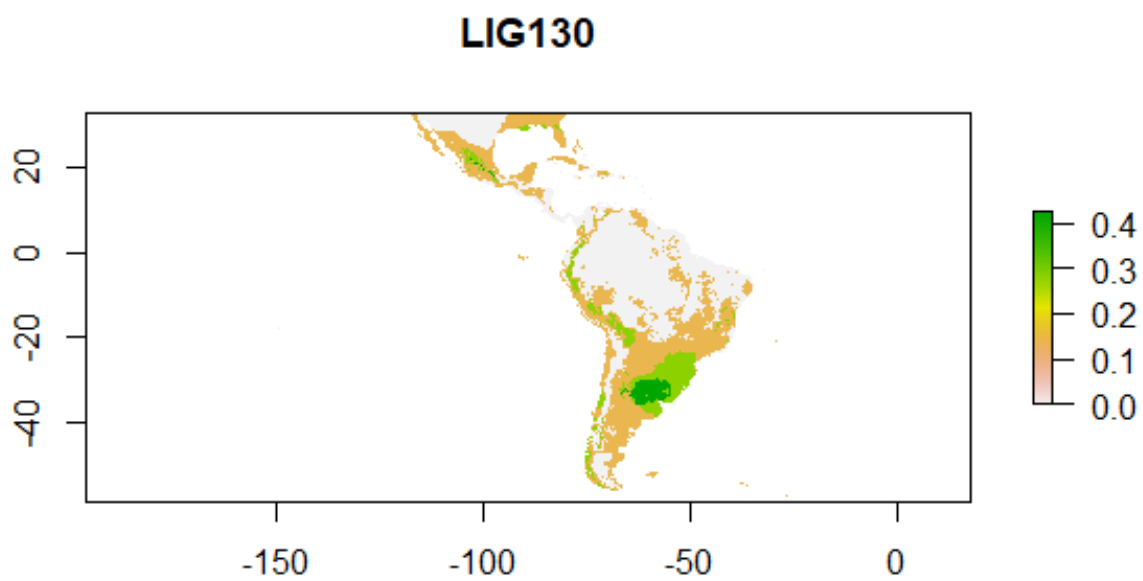


Figure 7.

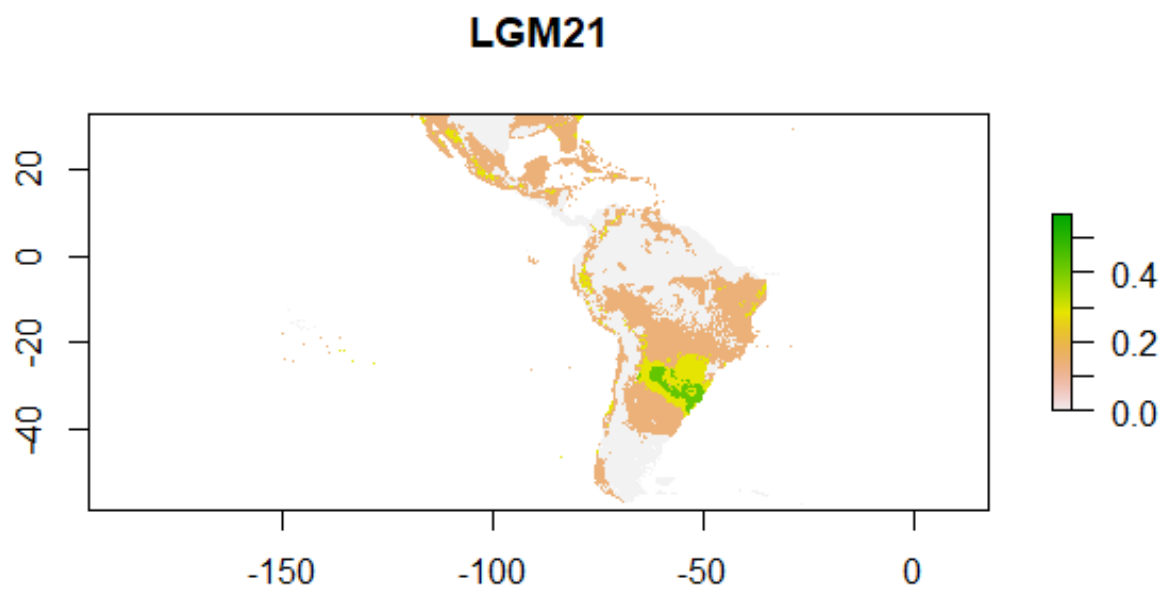


Figure 8.

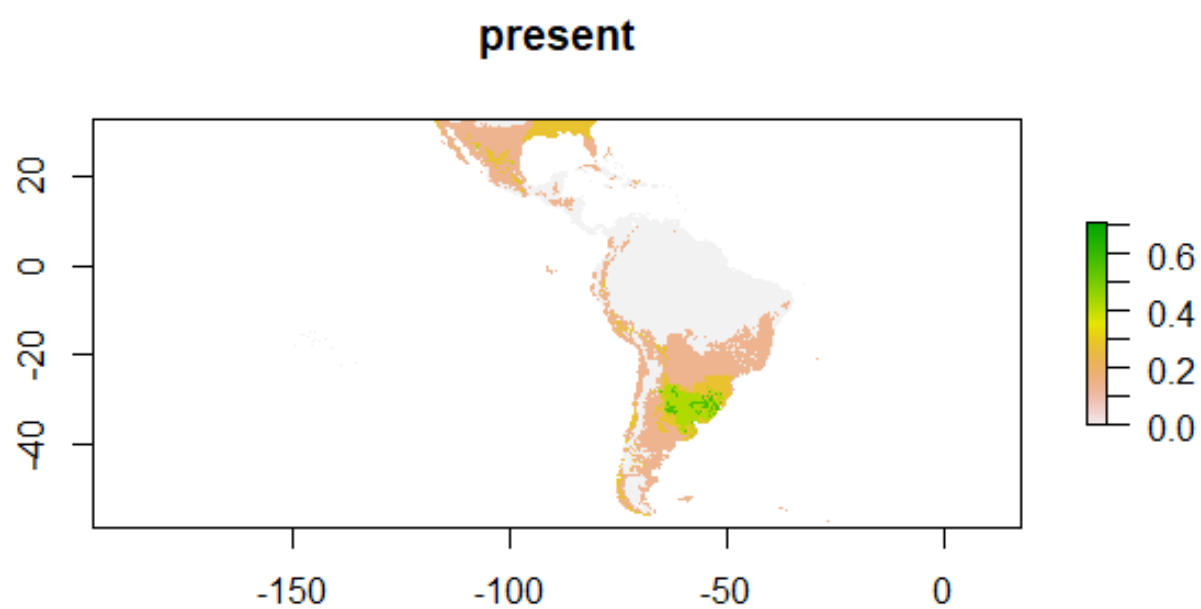


Figure 9.

SUPPORTING INFORMATION FILES

Table S1. *Belostoma angustum* collected in this study, with their respective collection points, geographic coordinates and GenBank accession numbers.

Sample	Region	City	Localities	Geographic coordinates		GenBank accession numbers			
				Long	Lat	COI	16SrRNA	ITS	
2417	CP1	Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816965	#	OL583855
2419		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816966	MN824254	OL583856
2422		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816967	MN824255	OL583857
2423		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816968	MN824256	#
2424		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816969	MN824257	#
2425		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816970	#	OL583858
2427		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816972	#	#
2428		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816973	#	#
2430		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816974	MN824259	OL583859
2431		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816904	#	#
2432		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816905	MN824260	#
2434		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816906	MN824261	OL583860
2435		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816907	MN824262	#
2436		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	MN816908	MN824263	#
2437		Coastal Plain	Rio Grande	Vila Sanra Rosa	-52.1974	-32.0917	#	MN824264	#
2252	CP2	Coastal Plain	Santa Vitória do Palmar	Sarita	-52.4361	-32.6791	MN816926	MN824320	#
2254		Coastal Plain	Santa Vitória do Palmar	Sarita	-52.4361	-32.6791	#	MN824322	#
2255		Coastal Plain	Santa Vitória do Palmar	Sarita	-52.4361	-32.6791	#	#	#
2256		Coastal Plain	Santa Vitória do Palmar	Sarita	-52.4361	-32.6791	#	MN824323	#
2257		Coastal Plain	Santa Vitória do Palmar	Sarita	-52.4361	-32.6791	#	MN824324	#
2524	CP3	Coastal Plain	Rio Grande	Senandes	-52.2810	-32.2478	MN816929	MN824334	OL583861
2189	CP4	Coastal Plain	Terra de Areia	Fepagro	-50.1050	-29.6408	MN816952	MN824413	#
2576	CP5	Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816910	MN824274	#

2577		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816911	MN824275	#
2578		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816984	#	#
2579		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816985	MN824276	#
2580		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816986	#	#
2581		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816987	#	#
2582		Coastal Plain	São José do Norte	Buturi	-51.7285	-31.8462	MN816988	MN824278	#
2586	CP6	Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817007	#	#
2587		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817008	MN824303	#
2588		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816918	#	#
2589		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816919	MN824304	#
2590		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816920	#	#
2594		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816921	MN824305	#
2596		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816922	#	#
2597		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816923	MN824307	#
2598		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817009	MN824308	#
2599		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816924	#	#
2600		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817010	#	#
2601		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817011	MN824310	#
2602		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN816925	MN824311	#
2603		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817012	MN824312	#
2604		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	#	MN824313	#
2606		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817014	MN824314	#
2609		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817015	MN824315	#
2610		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817016	#	#
2611		Coastal Plain	Mostardas	Talhamar	-50.9618	-31.2616	MN817017	MN824316	#
DP1a	DP1	Central Depression	São Gabriel		-54.2453	-30.3255	*	*	*
DP1af		Central Depression	São Gabriel		-54.2453	-30.3255	*	#	*
DP1b		Central Depression	São Gabriel		-54.2453	-30.3255	*	*	*

DP1bf		Central Depression	São Gabriel	-54.2453	-30.3255	*	#	*
DP1c		Central Depression	São Gabriel	-54.2453	-30.3255	#	*	*
DP1cf		Central Depression	São Gabriel	-54.2453	-30.3255	*	#	*
DP2a	DP2	Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	*	*
DP2af		Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	#	*
DP2b		Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	*	*
DP2bf		Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	#	*
DP2c		Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	*	*
DP2cf		Central Depression	São Gabriel	-54.4139	-30.5306	*	#	*
DP3a	DP3	Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	*	*	*
DP3af		Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	*	#	*
DP3b		Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	*	*	*
DP3bf		Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	#	#	*
DP3c		Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	*	*	#
DP3cf		Central Depression	Rosário do Sul	-54.7938	-30.5447	*	#	*
DP4a	DP4	Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	*	*
DP4af		Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	#	*
DP4b		Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	*	*
DP4bf		Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	#	*
DP4c		Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	*	*
DP4cf		Central Depression	Dom Pedrito	-54.5695	-30.8276	*	#	*
DP5a	DP5	Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	*	*	*
DP5af		Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	*	#	*
DP5b		Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	*	*	*
DP5bf		Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	#	#	*
DP5c		Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	*	*	*
DP5cf		Central Depression	Dom Pedrito	-54.9201	-30.9727	#	#	*
DP6a	DP6	Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	*	*	*

DP6af		Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	*	#	*
DP6b		Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	*	*	*
DP6bf		Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	*	#	#
DP6c		Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	*	*	#
DP6cf		Central Depression	Santana do Livramento	-54.6790	-31.2503	#	#	*
PC1a	PC1	Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	*	*
PC1af		Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	#	*
PC1b		Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	*	*
PC1bf		Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	#	*
PC1c		Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	*	*
PC1cf		Campanha Highland	Rosário do Sul	-55.2244	-30.3463	*	#	*
PC2a	PC2	Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	*	*
PC2af		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	#	*
PC2b		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	*	*
PC2bf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	#	*
PC2c		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	*	*
PC2cf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.5194	-30.6637	*	#	*
PC3a	PC3	Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	*	*
PC3af		Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	#	*
PC3b		Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	*	*
PC3bf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	#	*
PC3c		Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	*	*
PC3cf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-56.0004	-30.2879	*	#	*
PC4a	PC4	Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	*	*	*
PC4af		Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	*	#	*
PC4b		Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	*	*	*
PC4bf		Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	*	#	*
PC4c		Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	*	*	*

PC4cf		Campanha Highland	Quaraí	-55.6183	-30.4717	#	#	*
PC5a	PC5	Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	*	*	*
PC5af		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	#	#	*
PC5b		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	*	*	*
PC5bf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	*	#	*
PC5c		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	*	*	*
PC5cf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.8274	-30.6976	*	#	*
PC6a	PC6	Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	*	*
PC6af		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	#	*
PC6b		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	*	*
PC6bf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	#	*
PC6c		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	*	#
PC6cf		Campanha Highland	Santana do Livramento	-55.7712	-30.9922	*	#	*
PS1a	PS1	Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	*	*	*
PS1af		Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	#	#	*
PS1b		Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	*	*	*
PS1bf		Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	*	#	*
PS1c		Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	*	*	*
PS1cf		Sul-Rio-Grandense Highland	Barão do Triunfo	-51.8040	-30.4180	*	#	*
PS2a	PS2	Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	*	*
PS2af		Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	#	*
PS2b		Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	*	*

PS2bf	PS3	Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	#	*
PS2c		Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	*	*
PS2cf		Sul-Rio-Grandense Highland	Encruzilhada do Sul	-52.6152	-30.6309	*	#	*
PS3a		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	*	*
PS3af		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	#	*
PS3b		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	*	*
PS3bf		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	#	*
PS3c		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	*	#
PS3cf		Sul-Rio-Grandense Highland	Canguçu	-52.5438	-31.2528	*	#	*
PS4a	PS4	Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	*	*	*
PS4af		Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	*	#	*
PS4b		Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	*	*	*
PS4bf		Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	*	#	*
PS4c		Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	*	*	*
PS4cf	PS5	Sul-Rio-Grandense Highland	Pinheiro Machado	-53.3560	-31.5090	#	#	#
PS5a		Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	-53.8205	-31.1520	*	*	*
PS5af		Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	-53.8205	-31.1520	*	#	*
PS5b		Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	-53.8205	-31.1520	*	*	*

PS5bf	Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	−53.8205	−31.1520	*	#	*	
PS5c	Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	−53.8205	−31.1520	*	*	*	
PS5cf	Sul-Rio-Grandense Highland	Bagé	−53.8205	−31.1520	*	#	*	
PS6a	PS6	Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	*	*	*
PS6af		Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	*	#	*
PS6b		Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	*	#	*
PS6bf		Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	*	#	*
PS6c		Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	#	*	*
PS6cf		Sul-Rio-Grandense Highland	Caçapava do Sul	−30.5993	−53.4886	*	#	*

Obs.: * The haplotype sequences obtained from COI, ITS1 and 16S for samples from all regions (except for the coastal plain) are available in GenBank under accession numbers MG066539 - MG066580, MG195916 - MG195948 and MG209117 - MG209120, respectively.

Table S2. Values of AMOVA for 16SrRNA.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	7.794	0.09208 Va	26.53
Among populations within groups	22	7.575	0.01576 Vb	4.54
Within populations	146	34.925	0.23921 Vc	68.93
Total	169	50.294	0.34705	

*Fixation Indices: FST:0.23545 (P-value=0.00000+-0.00000); FSC:0.06182 (P-value = 0.00050+-0.00022); FCT:0.26532 (P-value = 0.00000+-0.00000).

Table S3. Values of AMOVA for COI.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	0.749	0.00062 Va	0.15
Among populations within groups	22	12.113	0.02837 Vb	6.70
Within populations	116	45.788	0.39472 Vc	93.16
Total	139	56.650	0.42372	

*Fixation Indices: FST: 0.06680 (0.01703+-0.00137); FSC: 0.06706 (P-value= 0.00871+-0.00082); FCT: 0.00147 (P-value= 0.28248+-0.00441).

Table S4. Values of AMOVA for ITS.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	0.976	0.01951 Va	6.45
Among populations within groups	17	8.820	0.02282 Vb	7.54
Within populations	197	51.283	0.26032 Vc	86.01
Total	215	61.079	0.30266	

*Fixation Indices: FST: 0.08303 (P-value=0.00000+-0.00000); FSC: 0.08060 (P-value= 0.00000+-0.00000); FCT:0.06447 (P-value= 0.16386+-0.00355).

Table S5. Values of AMOVA for mitochondrial concatenated matrix.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	8.290	0.08546 Va	8.59
Among populations within groups	22	32.840	0.11479 Vb	11.54
Within populations	132	104.902	0.79471 Vc	79.87
Total	155	146.032	0.99495	

*Fixation Indices: FST: 0.17160 (P-value=0.00000+-0.00000); FSC: 0.12621 (P-value= 0.00000+-0.00000); FCT: 0.08589 (P-value=0.00069+-0.00025).

Table S6. Values of AMOVA for concatenated matrix of COI + 16S + ITS.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	20.205	0.91496 Va	36.79
Among populations within groups	18	55.500	0.36897 Vb	14.83
Within populations	84	101.083	1.20337 Vc	48.38
Total	103	176.788	2.48730	

*Fixation Indices: FST: 0.32619 (P-value=0.00000+-0.00000); FSC: 0.23466 (P-value=0.00000+-0.00000); FCT: 0.36785 (P-value= 0.00515+-0.00072).

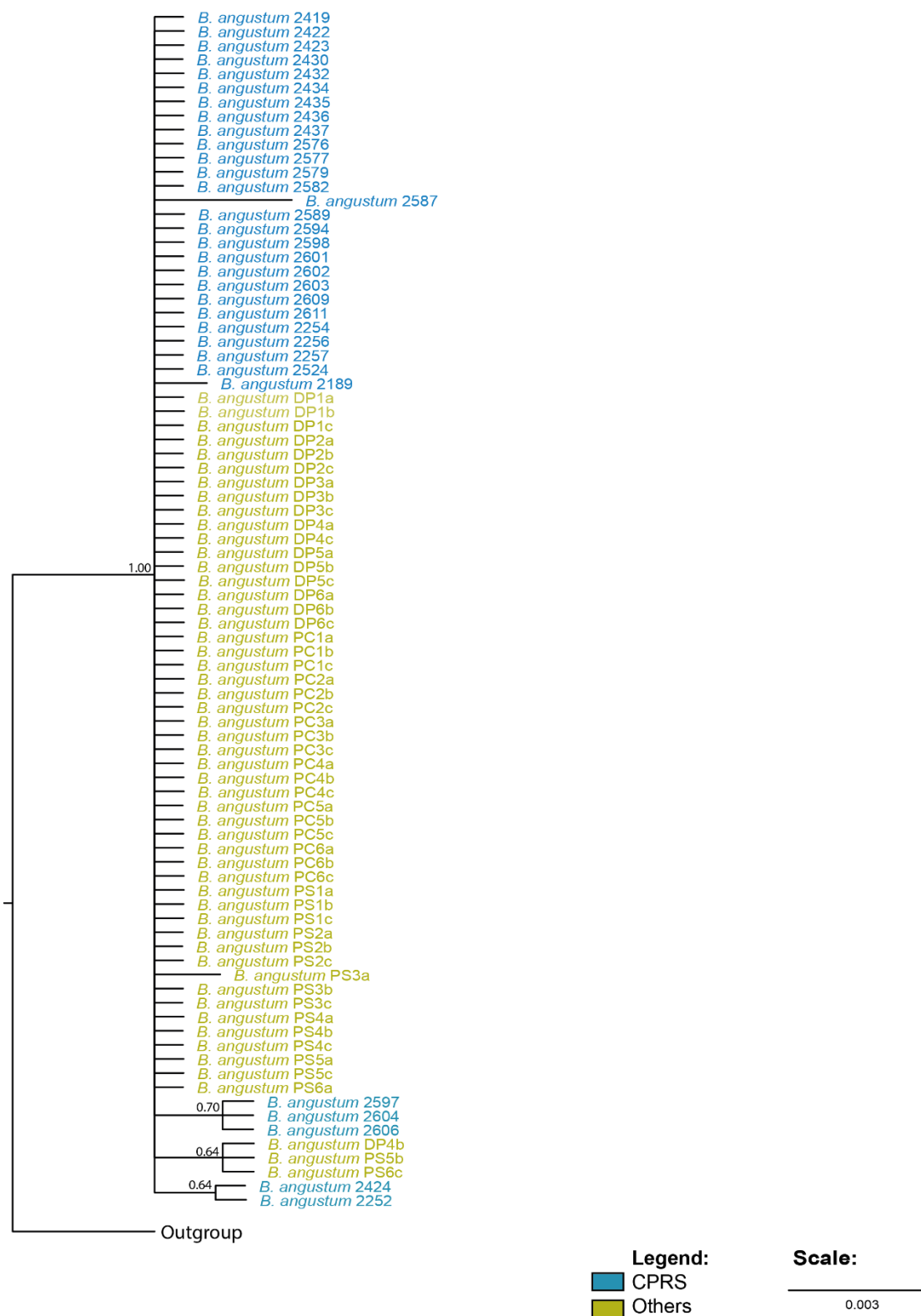


Figure S2. Phylogenetic tree of Bayesian Analysis of 16S gene. Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.

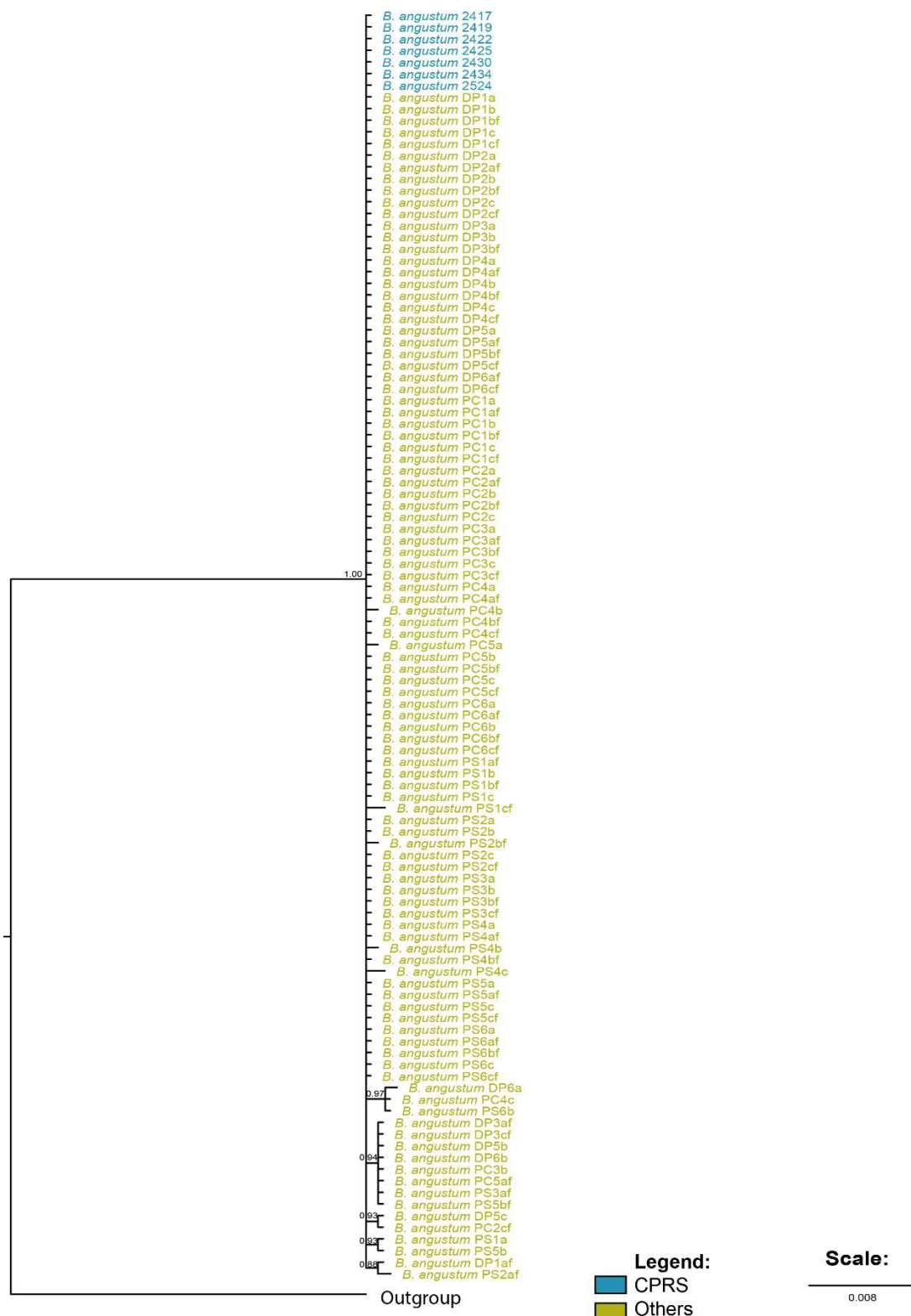


Figure S3. Phylogenetic tree of Bayesian Analysis of ITS gene. Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.

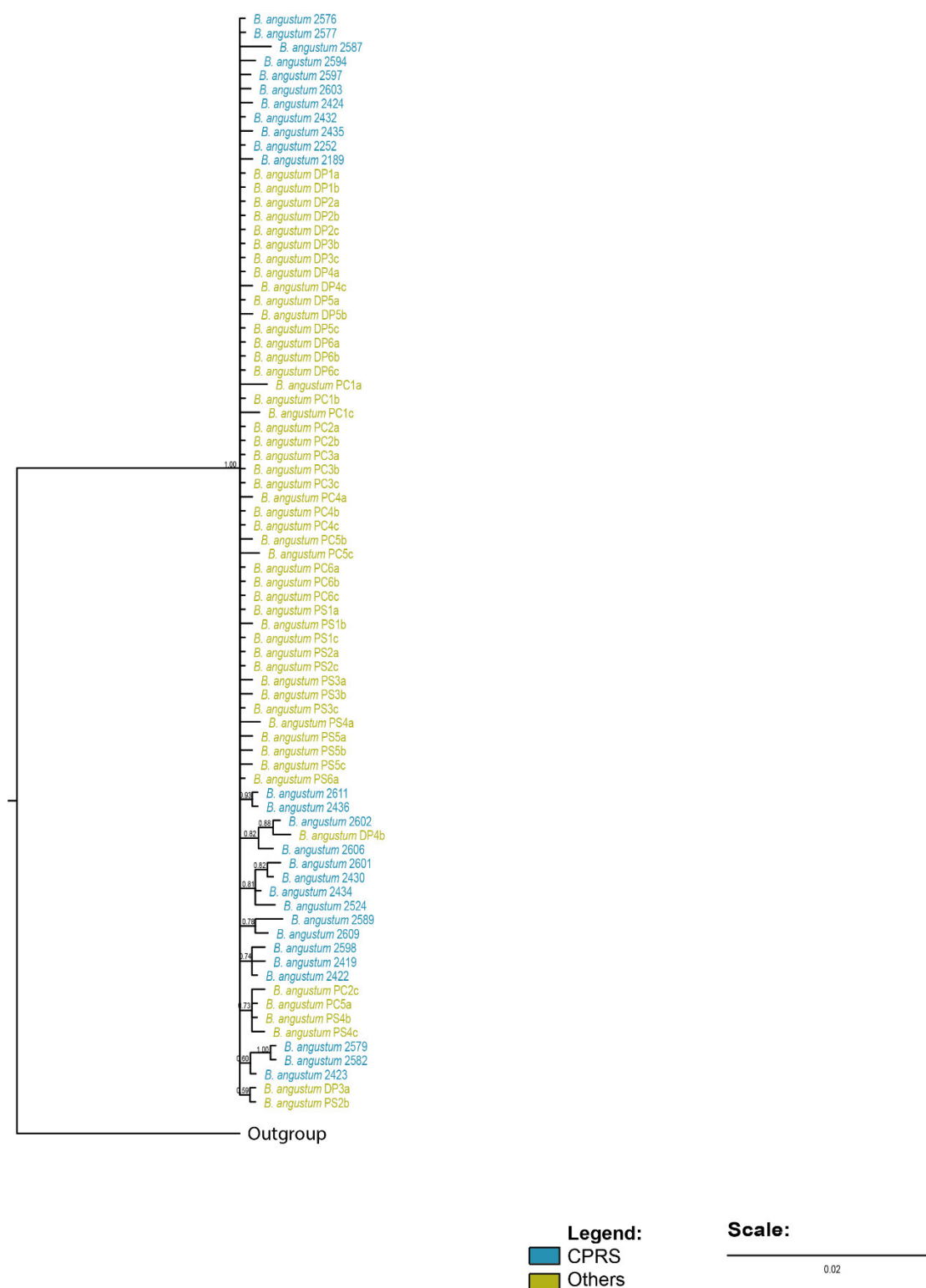


Figure S4. Phylogenetic tree obtained with the multi-locus dataset (the mitochondrial COI and 16S genes, and the nuclear ITS marker). Values above internal nodes refer to the posterior probability of each clade.

CAPÍTULO 3

DNA Barcoding de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies

Artigo a ser submetido na revista Acta Tropica. Fator de impacto: 3.112; Qualis na Biodiversidade:

B1

Normas de formatação:

<https://www.elsevier.com/journals/acta-tropica/0001-706X/guide-for-authors>

DNA Barcoding de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico, com insights acerca das relações filogenéticas entre espécies

Thaísa B Gauterio¹, Daiane Carrasco Chaves ¹, Lizandra J Robe^{1,2*}

¹Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC), Av. Itália, km 08, Brazil.

²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA), Avenida Roraima, 1000, Brazil.

* lizbiogen@gmail.com

Abstract

O gênero *Culicoides* apresenta mais de 1.300 espécies, que são conhecidas popularmente como “maruim”, “meruim”, “mosquito-polvora” ou “mosquito do manguê”. Estas espécies possuem extrema importância médica e veterinária, e, conseqüentemente, econômica, pois são transmissoras de diversos tipos de doenças, como Bluetongue, Oropouche, doença do cavalo africano, Encefalite Equina entre outros, que afetam o gado, ovelhas, cavalos e, no caso da febre Oropouche, os seres humanos. As espécies são extremamente pequenas, variam de 1 a 3mm e, por isso, de difícil identificação morfológica. Além disso, as chaves de identificação do grupo consideram principalmente os caracteres das manchas das asas como caracteres diagnósticos, o que pode levar a incongruências na identificação das espécies. Desta forma, mesmo contendo espécies com importância médica e veterinária, *Culicoides* carece de meios mais efetivos de identificação e delimitação de espécies, bem como de avaliações mais amplas acerca das relações filogenéticas entre espécies. Por isso, o objetivo do estudo foi avaliar a efetividade da ferramenta de DNA Barcode para a identificação e/ou delimitação de espécies de *Culicoides*, auxiliando na compreensão dos seus níveis de diversidade críptica e das relações filogenéticas entre espécies. Para isso, foram coletados espécimes de *Culicoides* em 10 pontos distribuídos no estado do Rio Grande do Sul. Os espécimes coletados tiveram seu DNA extraído e os genes COI, 16S e 28S amplificados, purificados e sequenciados. Após, foram realizadas análises filogenéticas, de distância e de coalescência para cada gene. Segundo as análises filogenéticas realizadas para COI, 28S e 16S, foram recuperados 12, 11 e sete linhagens, respectivamente. Dentre estas, *C. bambusicola* e *C. impusilloides* se revelaram reciprocamente monofiléticas, espécimes de *C. alvarezi*, *C. fernandoi* e *C. venezuelensis* foram subdivididas em linhagens distintas e *C. insignis* revelou-se parafilética com relação a *C. guttatus* e um espécime de *C. fernandoi*. Assim, os resultados demonstraram a efetividade de ferramentas associadas ao DNA Barcode para a identificação de espécies no grupo, e demonstraram importantes limitações no uso dos padrões de manchas nas asas como caracter diagnóstico das espécies Neotrópicas de *Culicoides*.

Palavras-chave: DNA Barcoding, maruim, COI, 16SrRNA, 28SrRNA.

INTRODUÇÃO

O gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) apresenta mais de 1.300 espécies com cerca de 1-3mm de tamanho corporal (Castellón & Veras, 2015), popularmente conhecidas como “maruim”, “meruim”, “mosquito-pólvora” ou “mosquito-do-mangue”. Estas são espécies hematófagas que se distribuem mundialmente, exceto na Nova Zelândia, nas Ilhas Havaianas e nas regiões polares (Borkent, 2012). Grande parte (90%) das espécies de *Culicoides* pertencem à 33 subgêneros e 38 grupos de espécies informais, enquanto os 10% restantes constituem espécies não alocadas (Rot et al. 2020). No entanto, é bastante provável que o número de espécies de *Culicoides* represente uma subestimativa, devido tanto ao déficit de identificação causado pela extrema dificuldade de identificação através de caracteres morfológicos quanto à presença de espécies crípticas. Por outro lado, a subdivisão de espécies em subgêneros e grupos foi estabelecida principalmente com base em caracteres morfológicos (Borkent & Spinelli, 2007), que podem apresentar diferentes níveis de plasticidade ou canalização, e explicitam a necessidade de testes adicionais.

As espécies de *Culicoides* podem atuar como vetores de diversas doenças com importância médica, veterinária e, conseqüentemente, econômica. Entre as doenças mais conhecidas transmitidas especialmente pelas fêmeas do gênero destacam-se: *Bluetongue*, uma doença que afeta tanto o gado quanto as ovelhas (embora os primeiros possam permanecer assintomáticos), caracterizada por febre, inflamação e ulceração da mucosa nasal e da boca, causando dor e dificuldade para se alimentar, e podendo levar a óbito por asfixia devido ao inchaço da língua e obstrução das vias aéreas. A coloração azul da língua é a característica que dá o nome à doença (Castellon & Veras, 2015). Outras doenças de grande importância veterinária que também podem ser transmitidas por *Culicoides* são a Encefalite Equina, a Doença do Cavalo Africano, a Doença Hemorrágica Epizootica, Schmallenberg e, em humanos, a febre Oropouche (Castellón e Veras,

2015; Barber et al., 2018; Rovid, 2015). Esta última é caracterizada por estado febril, dores musculares e de cabeça, tonteira, arrepios, conjuntivite, náuseas, vômitos, diarreia e coriza (Pinheiro et al., 1981). Há registros de sete surtos de febre Oropouche no Brasil de 1961 a 1978, todos no estado do Pará (Castellón e Veras, 2015). Além disso, as espécies de *Culicoides* podem ser agentes etiológicos de diversos outros tipos de vírus como *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Orbivirus* (Martínez-de la Puente et al., 2015). Por fim, além da transmissão de doenças, a picada dos maruins é dolorosa e característica por causar grande desconforto, com inchaço local, coceira intensa, formação de pústulas, e até febre e inflamações em casos mais graves.

Atualmente, a identificação morfológica de *Culicoides* é realizada principalmente por meio da caracterização dos ornamentos das asas, o que permite a identificação, em alguns casos, até o nível de espécie (Wirth & Spinelli, 2007). No entanto, esta metodologia possui importantes limitações, como, por exemplo, a identificação sexo-específica de fêmeas, já que os machos costumam apresentar asas mais estreitas e não são contemplados nas chaves de identificação. Além disso, o porte extremamente pequeno das espécies e a ausência de chaves de identificação que incluam espécies a nível global conferem dificuldades adicionais aos taxonomistas. Por outro lado, a falta de taxonomistas capacitados para realizar as identificações morfológicas, somada a presença de chaves de identificação imprecisas e dadas a interpretações divergentes, torna a identificação de espécies de *Culicoides* um importante desafio. Isso demonstra a importância de uma ferramenta mais eficiente, confiável, rápida e simplificada para a identificação das espécies, que se faz necessária não apenas para fins acadêmicos, como também para controle e manejo das espécies responsáveis pela transmissão de doenças. Ferramentas de identificação molecular, como o DNA Barcoding, podem fornecer uma contribuição significativa para essa tarefa, ao permitir não apenas a identificação de espécies, como a delimitação de espécies potencialmente novas, auxiliando na

descoberta dos níveis crípticos ou desconhecidos de biodiversidade (Hebert et al., 2004b; Yassin et al., 2008). O DNA Barcoding, em particular, propõe o cumprimento destas tarefas por meio de um pequeno fragmento de DNA mitocondrial contendo a região parte da região 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I, que em última análise funciona como um “código de barras” da espécie (Hebert et al. 2003). O principal pressuposto para a aplicabilidade desta técnica é a existência de um Barcoding Gap, onde as distâncias intraespecíficas (distâncias genéticas entre indivíduos da mesma espécie) sejam menores do que as distâncias interespecíficas (distâncias genéticas entre indivíduos de espécies diferentes) (Hebert et al. 2003; Hebert et al. 2004a). Para que esta suposição seja cumprida, é importante que as espécies individuais sejam reciprocamente monofiléticas. Para tentar superar alguns dos potenciais problemas associados a metodologia do DNA Barcoding, o uso de análises complementares, junto com o emprego de diferentes marcadores vem sendo cada vez mais defendido (Joshi & Agarwal, 2021; Daglio & Dawson, 2019). Além de fornecer respostas mais robustas acerca da identidade das espécies, o emprego de um número maior de ferramentas e marcadores também costuma fornecer informações importantes sobre as relações filogenéticas entre espécies.

Até o momento, existem relativamente poucos artigos abordando a ferramenta do DNA Barcode e as relações filogenéticas entre *Culicoides* (Pagès et al., 2009; Videvall et al., 2013; Harrup et al., 2016; Bakhoun et al. 2018; Jomkumsing et al., 2021). Estes trabalhos têm revelado resultados promissores, mas ainda apresentam importantes lacunas no que se refere a inclusão de espécies Neotropicais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi fornecer subsídios que auxiliem na identificação das espécies já descritas de *Culicoides* no Neotrópico, avaliando também a presença de diversidade críptica ou não reconhecida dentro do gênero e as relações filogenéticas entre espécies. Para tanto, foram empregadas técnicas associadas ao DNA-

Barcoding, mas com inclusão de outros marcadores moleculares e morfológicos (ornamentos das asas).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Identificação

Os espécimes utilizados neste trabalho foram coletados em 10 pontos distribuídos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, nos municípios de Rio Grande, Pelotas, Santa Maria, Horizontina, Porto Alegre, São José do Norte e Capão do Leão (Tabela S1). Os espécimes foram coletados utilizando armadilha luminosa Luiz de Queiroz no período de 17h até 8h da manhã seguinte. Os indivíduos coletados foram então diretamente mergulhados em etanol absoluto e posteriormente armazenados em laboratório a temperatura de -20°C.

A identificação morfológica foi realizada através dos ornamentos e manchas das asas, utilizando a chave de identificação elaborada por Wirth & Spinelli (2007). Lâminas das asas foram montadas em Bálsamo do Canadá, segundo protocolo de Wirth & Marston (1968). Para isso foram utilizados pelo menos um indivíduo de cada espécie, incluindo, sempre que possível, uma amostra de cada sexo para cada ponto de coleta.

Manipulação do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando kit NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL).

Os genes mitocondriais Citocromo C oxidase subunidade I (COI), 16SrRNA e o gene nuclear 28SrRNA foram então amplificados utilizando os seguintes pares de primers: LepF: 5' ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG 3' e LepR: 5' TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3' (Augot et al. 2017); LRK13417: 5' CGCCTGTTTAACAAAAACAT 3' (Simon et al. 1994) e LRJ12961: 5'

TTTAATCCAACATCGAGG 3' (Cognato & Vogler, 2001) e DD: 5' GGGACCCGTCTTGAAACAC 3' e FF: 5' TTACACACTCCTTAGCGGAT 3' (Hillis e Dixon, 1991), respectivamente. Para as PCRs, a cada reação de 20 µl, foram adicionados 50-100 ng de DNA a um mix contendo 1 × tampão, 1 µM de cada iniciador, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ e 0,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação de COI foi realizada por uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45seg., anelamento a 55-57°C por 45seg. e extensão a 72°C por 1min, e mais um ciclo de extensão final 72°C por 7 min. A amplificação de 16S foi realizada por uma desnaturação inicial de 94°C por 1 min., seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 52.5°C e extensão a 72°C durante 1min, e, por fim, uma extensão final a 72°C por 7 min. E, finalmente, a amplificação de 28S se deu por uma desnaturação inicial de 94°C por 3min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30seg., anelamento a 58°C por 1min e 30 seg. e desnaturação a 68°C por 1min e por uma extensão final a 68°C por 10 min. Os amplicons obtidos foram purificados com uma solução contendo 7,5M de acetato de amônio (C₂H₇NO₂), sendo então diretamente sequenciados pela empresa MACROGEN (Seul, Coreia do Sul) em um sequenciador automático 23 ABI 3730XLs, utilizando os mesmos primers da PCR.

Análises filogenéticas, de distância e de coalescência

Primeiramente, as sequências contidas nos eletroferogramas tiveram sua identidade confirmada pelo uso do BLASTN (NCBI, 2021). Todos os eletroferogramas obtidos foram então inspecionados e montados com o uso do programa Gap4, do pacote Staden (Staden, 1996). Os alinhamentos foram realizados com o uso do algoritmo ClustalW, como apresentado no programa Mega 7.0 (Tamura et al., 2013).

As análises filogenéticas foram realizadas, individual e simultaneamente, através de análises Bayesianas, conduzidas no programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), utilizando o modelo SYM+G, que foi selecionado pelo Akaike Information Criterion implementado no MrModeltest2 (Nylander, 2004) para cada um dos três genes. As árvores foram enraizadas utilizando *Chironomus tepperi* como *outgroup*.

Em seguida, as distâncias intra e inter-clados, bem como as distâncias intra e interespecíficas, foram calculadas no Mega 7.0, utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros. Uma análise Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) foi ainda realizada através do modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) utilizando um prior de 0,04 em ABGD Web (ABGD Web, 2021), sem nenhuma especificação a priori envolvendo a identidade ou o número de espécies.

Por fim, uma análise de coalescência Generalised Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons et al., 2006; Fontaneto et al., 2007; Fujisawa e Barraclough, 2013) foi realizada utilizando o software RStudio e o pacote de dados “ape”, “paran”, “rnc1” e “splits”. Para esta análise, uma árvore ultramétrica foi inicialmente gerada no Beast 2.4.8 (Drummond et al., 2012) sob um modelo estrito de relógio molecular. O modelo de substituições nucleotídicas utilizado foi o SYM+G, sugerido pelo AIC realizado no MrModelTest2. As corridas de MCMC envolveram 500.000.000 de gerações, amostrando a cada 5.000, com 10% de burnin. Ainda sob uma perspectiva de coalescência, as relações entre os haplótipos foram inferidas através da construção de redes de haplótipos ou networks, através do algoritmo de median-joining, no software Network 5.0.1.1 (Bandelt et al., 1999).

RESULTADOS

Foram coletados um total de 75 espécimes, sendo que 55 deles foram destinados à análise molecular: 35 machos e 20 fêmeas (Tabela S1); e 20 destinados a montagem de lâminas. Destes,

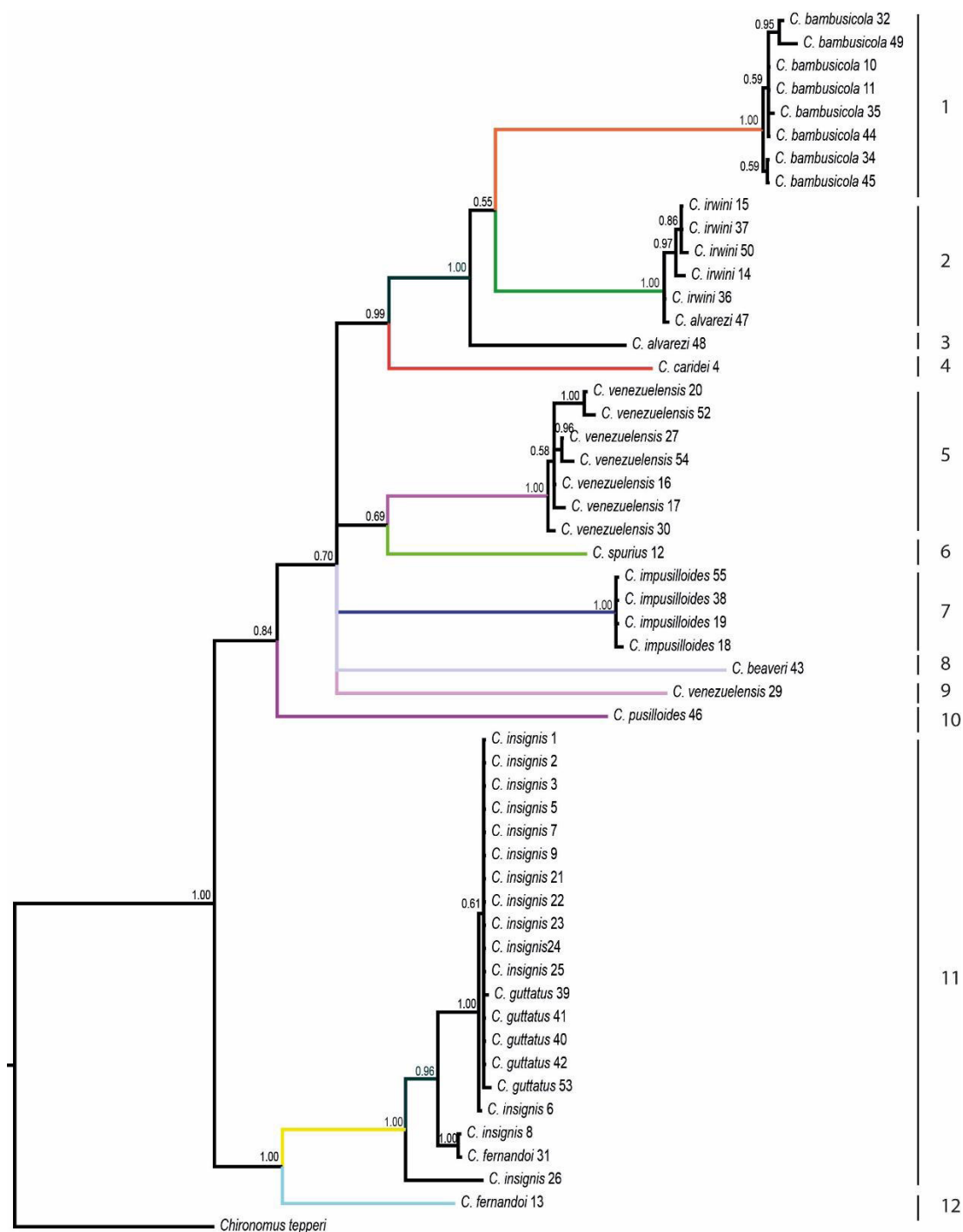
52 foram caracterizados para o gene COI, 28 para 16SrRNA e 45 para 28SrRNA. De acordo com as identificações morfológicas, foram amostradas as um total de 12 espécies: *C. alvarezi* (n = 2), *C. bambusicola* (n = 9), *C. beaveri* (n = 1), *C. caridei* (n = 1), *C. fernandoi* (n = 2), *C. guttatus* (n = 5), *C. impusilloides* (n = 4), *C. insignis* (n = 14), *C. irwini* (n = 4), *C. pusilloides* (n = 1), *C. spurius* (n = 1) e *C. venezuelensis* (n = 10).

Na análise de COI (Figura 1), a análise da matriz de dados resultou em dois grandes grupos (PP=1.00): o primeiro formado pelas linhagens amarela [*C. insignis* + *C. guttatus* + *C. fernandoi* (espécime 13)] e ciano [*C. fernandoi* (espécime 31)], representando o subgênero *hoffmania*, e a segunda formada pelas linhagens roxa (*C. pusilloides* - subgênero *Avaritia*), rosa claro [*C. venezuelensis* (espécime 29) - subgênero subgênero *Psychophaena*], lilás (*C. beaveri* - grupo *daedalus*), azul (*C. impusilloides* - subgênero *Avaritia*), verde claro (*C. spurius* - subgênero *Haematomyidium*), rosa (*C. venezuelensis* - subgênero *Psychophaena*), vermelha (*C. caridei* - subgênero *Cotocripus*), preta [*C. alvarezi* (espécime 48), grupo *stigmalis*], verde [*C. irwini* + *C. alvarezi* (espécime 47) - subgênero *Cotocripus* e grupo *stigmalis*, respectivamente) e laranja (*C. bambusicola* - subgênero *Cotocripus*). Assim, das oito espécies que tiveram mais de um espécime caracterizada para COI, apenas *C. bambusicola* e *C. impusilloides* se apresentaram monofiléticas. De fato, *C. insignis*, *C. irwini* se revelaram parafiléticas com relação a *C. guttatus/C. fernandoi* e *C. alvarezi*, respectivamente. Por outro lado, *C. alvarezi*, *C. fernandoi* e *C. venezuelensis* foram recuperadas como polifiléticas.

A conformação das linhagens resultantes da análise 28S (Figura 2) foi semelhante àquela encontrada para COI. Assim como no gene mitocondrial, 28S apresentou uma divisão em dois grandes grupos (PP=1.00), porém a constituição destes grupos foi diferente. As linhagens laranja, verde escura e vermelha, que correspondem a *C. bambusicola*, *C. irwini* + *C. caridei* (subgênero *Cotocripus*) e *C. alvarezi* (grupo *stigmalis*) formaram um grupo separado do restante das espécies,

enquanto as linhagens roxa e azul (*C. pusilloides* e *C. impusilloides*, respectivamente - subgênero *Avaritia*), verde clara (*C. spurius* - subgênero *Haematomydium*) e rosa (*C. venezuelensis* - subgênero *Psychophaena*) agruparam com as linhagens ciano [*C. fernandoi* (espécime 31)] e amarela [*C. insignis* + *C. guttatus* + *C. fernandoi* (espécime 13)] . Ainda assim, a constituição das linhagens permaneceu bastante semelhante, e apenas *C. bambusicola* e *C. impusilloides* apresentaram-se monofiléticas.

Já para 16S (Figura 3), a conformação das linhagens formou uma politomia, exceto pelo agrupamento das linhagens amarela [*C. insignis* + *C. guttatus*] e ciano [*C. fernandoi* (espécime 13)], recuperando a monofilia do subgênero *hoffmania* (PP=1.00); pela linhagem rosa (*C. venezuelensis* - subgênero *Psychophaena*) (PP=1.00), e pelo agrupamento das linhagens azul (*C. impusilloides* - subgênero *Avaritia*) e verde clara (*C. spurius* - subgênero *Haematomydium*) (PP=0.73). Neste caso, como o espécime 29 de *C. venezuelensis* não foi caracterizado para este marcador, esta espécie revelou-se reciprocamente monofilética com relação às demais. Ademais, *C. impusilloides* foi recuperada como monofilética, enquanto *C. insignis* se revelou parafilética com relação a *C. guttatus*.



Escala:

0.04

Figura 1. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para COI. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.

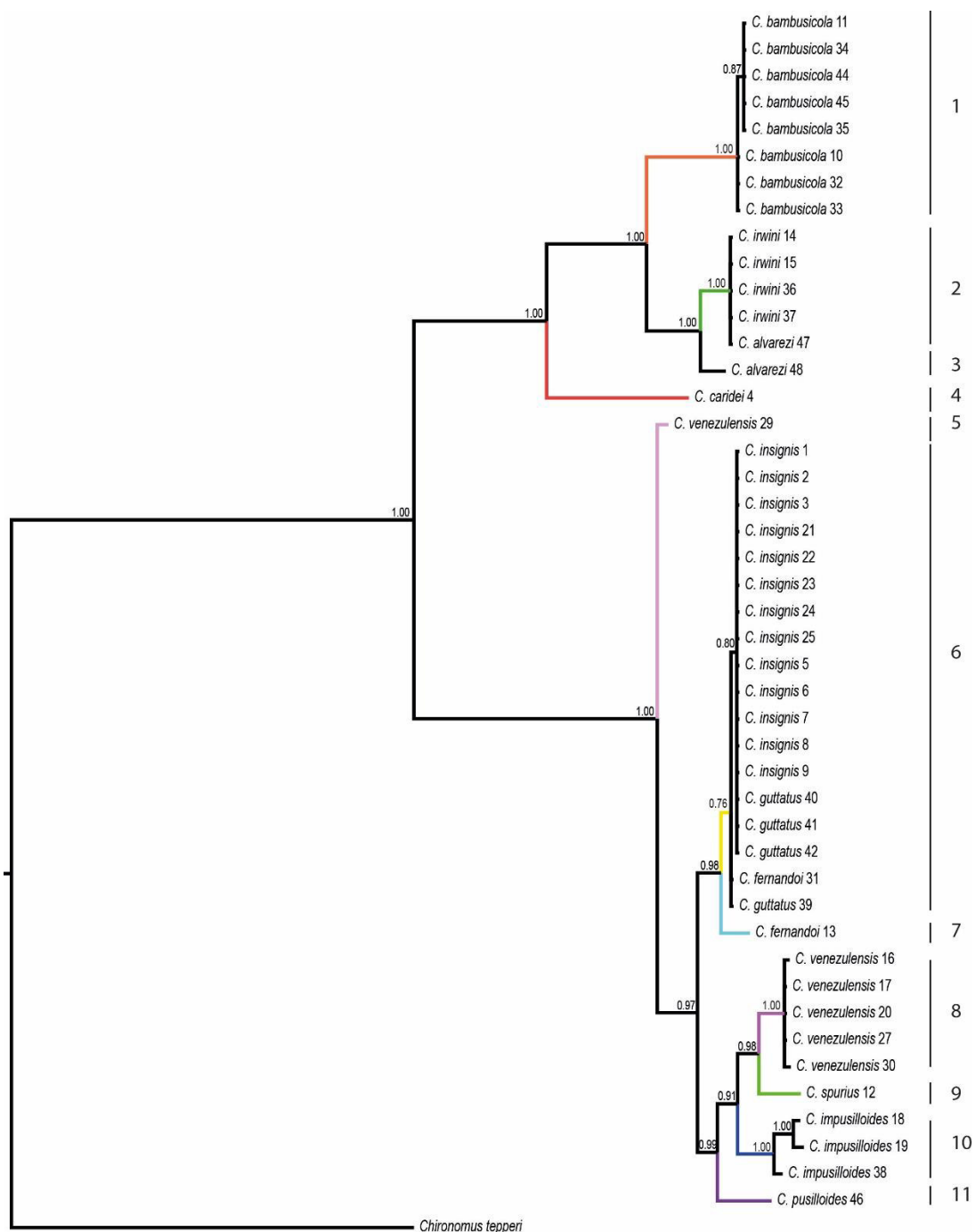


Figura 2. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para 28S. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.

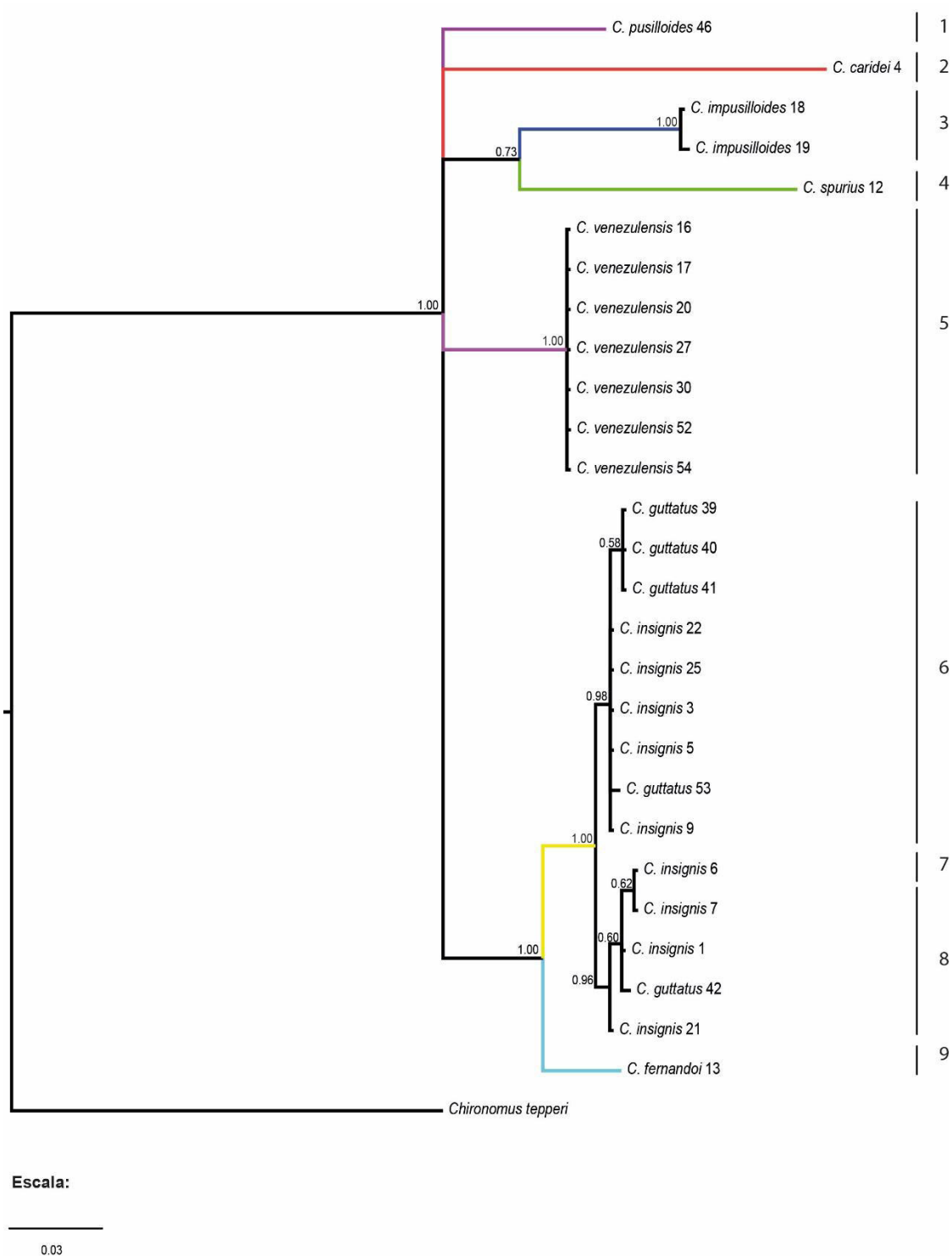


Figura 3. Árvore filogenética recuperada através de análise Bayesiana a partir da matriz obtida para 16S. Valores acima dos nós internos se referem a probabilidade posterior de cada clado. As linhas verticais representam os agrupamentos recuperados pela análise ABGD.

Assim, os três marcadores recuperaram a monofilia da linhagem amarela composta por *C. insignis*, *C. guttatus* e *C. fernandoi* com altos valores de PP (1.0, 1.0 e 0.76) para COI, 16S e 28S, respectivamente. O espécime 13 de *C. fernandoi* apareceu em um ramo único (linhagem ciano) e irmão do clado amarelo em todas as análises recuperando a monofilia do subgênero *Hoffmania* (PP = 1.0, 1.0 e 0.98 para COI, 16S e 28S, respectivamente) e sugerindo a presença de diversidade críptica em *C. fernandoi*. O mesmo aconteceu com os dois espécimes de *C. alvarezi*, que parecem não compartilhar um ancestral comum mais recente entre si do que com relação a *C. irwini* e *C. bambusicola*. As linhagens azul (*C. impusilloides*) (PP=1.00 em todas as análises) e laranja (*C. bambusicola*) (PP=1.00 para COI e 28S) tiveram sua monofilia recuperada em todas as análises em que as mesmas foram empregadas (*C. bambusicola* não foi incluso na análise de 16S). Em todas as análises, *C. venezuelensis* ficou dividida em duas linhagens, uma vez que o espécime 29 revelou-se geneticamente distinto dos demais. As espécies representadas por apenas um espécime (*C. pusilloides*, *C. spurius*, *C. caridei* e *C. beaveri*) apresentaram-se como linhagens distintas em todas as análises.

Distâncias intra e interclados

De acordo com as análises pareadas de distâncias, as distâncias intra-linhagens de COI variaram entre 0% a 6.78% (Tabela 1). Neste caso, os maiores valores foram recuperados em comparações internas envolvendo a linhagem amarela, que apresenta alguns espécimes de *C. insignis* e *C. fernandoi* bastante divergentes. Para as demais linhagens, as distâncias pareadas internas não passaram de 2.08% (clado azul). Devido à alta divergência entre as linhagens (distância interlinhagens), foi recuperado o *Barcoding gap* para todas as linhagens nas análises

envolvendo COI, com valor mínimo de 6.52% para a linhagem amarela. Todos os outros agrupamentos mostraram valores de *Barcoding gap* maiores de 12%.

Para 16S, as distâncias intralinhagens variaram de 0% a 1.98% (linhagem amarela) e as distâncias interlinhagens variaram de 5.8% (linhagem amarela) a 24.18% (linhagem rosa) (Tabela 2). E, por último, para 28S os valores das distâncias intralinhagens variaram de 0% a 6.78% (linhagem amarela) e as interlinhagens variaram de 12.6% a 26.8% (Tabela 3). Assim, tanto para 16S quanto para 28S, também foi recuperado o *Barcoding gap* para todas as linhagens, sendo que o menor valor de *Barcoding gap* foi encontrado para a linhagem amarela em todas as análises, e o maior valor para *C. pusilloides* (para as análises de COI e 28S) e *C. spurius* (para a análise de 16S).

Tabela 1. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de COI.

Linhagens		Distâncias Mín. (%)	Distâncias Máx. (%)	BG ¹
Amarelo	Intralinagem	0.00	6.78	6.52
	Interlinagem	13.3	23.7	
Ciano	Intralinagem	0.00	0.00	13.3
	Interlinagem	13.3	23.0	
Rosa	Intralinagem	0.16	2.39	13.61
	Interlinagem	16.0	24.9	
Roxo	Intralinagem	0.00	0.00	22.1
	Interlinagem	22.1	26.2	
Preto	Intralinagem	0.00	0.00	12.6
	Interlinagem	12.6	23.6	
Vermelho	Intralinagem	0.00	0.00	17.8
	Interlinagem	17.8	23.3	
Rosa Claro	Intralinagem	0.00	0.00	20.2
	Interlinagem	20.2	26.8	
Verde	Intralinagem	0.00	1.19	11.41
	Interlinagem	12.6	24.1	
Azul	Intralinagem	0.00	2.08	15.32
	Interlinagem	17.4	26.2	
Lilás	Intralinagem	0.00	0.00	20.0
	Interlinagem	20.0	26.2	
Verde Claro	Intralinagem	0.00	0.00	16.0
	Interlinagem	16.0	25.6	
Laranja	Intralinagem	0.00	1.39	15.61
	Interlinagem	17.0	26.8	

¹*Barcode gap* (subtração da distância intra máxima da distância inter mínima).

Tabela 2. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de 16S.

Linhagens		Distância Mín. (%)	Distância Máx. (%)	BG¹
Amarelo	Intralinagem	0.00	1.98	3.82
	Interlinagem	5.8	20.15	
Ciano	Intralinagem	0.00	0.00	5.81
	Interlinagem	5.81	20.15	
Rosa	Intralinagem	0.00	0.00	11.88
	Interlinagem	11.88	24.18	
Roxo	Intralinagem	0.00	0.00	12.16
	Interlinagem	12.16	22.31	
Vermelho	Intralinagem	0.00	0.00	20.15
	Interlinagem	20.15	24.18	
Azul	Intralinagem	0.00	0.27	13.85
	Interlinagem	14.12	23.27	
Verde Claro	Intralinagem	0.00	0.00	16.96
	Interlinagem	16.96	22.41	

¹*Barcode gap* (subtração da distância intra máxima da distância inter mínima).

Tabela 3. Intervalos entre as distâncias mínimas e máximas intra e interlinhagens com relação a cada uma das linhagens recuperadas pela análise de 28S.

Linhagens		Distância Mín. (%)	Distância Máx. (%)	BG ¹
Amarelo	Intralinhagem	0.00	6.78	6.52
	Interlinhagem	13.3	23.7	
Ciano	Intralinhagem	0.00	0.00	13.3
	Interlinhagem	13.3	23.0	
Rosa	Intralinhagem	0.16	2.39	13.61
	Interlinhagem	16.0	24.9	
Roxo	Intralinhagem	0.00	0.00	22.1
	Interlinhagem	22.1	26.2	
Preto	Intralinhagem	0.00	0.00	12.6
	Interlinhagem	12.6	23.6	
Vermelho	Intralinhagem	0.00	0.00	17.8
	Interlinhagem	17.8	23.3	
Rosa Claro	Intralinhagem	0.00	0.00	20.2
	Interlinhagem	20.2	26.8	
Verde	Intralinhagem	0.00	0.00	11.41
	Interlinhagem	12.6	24.1	
Azul	Intralinhagem	0.00	0.00	15.32
	Interlinhagem	17.4	26.2	
Verde Claro	Intralinhagem	0.00	0.00	16.0
	Interlinhagem	16.0	25.6	
Laranja	Intralinhagem	0.00	1.39	15.61
	Interlinhagem	17.0	26.8	

¹Barcode gap (subtração da distância intra máxima da distância inter mínima).

Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

A análise ABGD de COI, 28S e 16S recuperou 12, 11 e 9 grupos representados pelas linhas verticais nas Figuras 1, 2 e 3.

Análise de coalescência GMYC

A GMYC de COI dividiu a matriz de dados em 15 grupos: 1) *C. bambusicola*, 2) *C. irwini* juntamente com o espécime 47 de *C. alvarezi*; 3) *C. insignis* + *C. gutattus*; 4) *C. fernandoi* (espécime 31) + *C. insignis* (espécime 8); 5 e 6) subdivisões de *C. venezuelensis*; 7) *C.*

impusilloides; 8) *C. spurius*; 9) *C. fernandoi* (espécime 13); 10) *C. insignis* (espécime 26); 11) *C. venezuelensis* (espécime 29); 12) *C. beaveri*; 13) *C. pusilloides*; 14) *C. alvarezi* (espécime 48) e 15) *C. caridei*. A análise de 28S foi semelhante a análise de COI, porém formou 11 grupos, uma vez que *C. fernandoi* (espécime 31) e *C. insignis* (espécime 8), que em COI formaram um grupo distinto, foram aqui reunidos ao grande grupo que inclui *C. insignis*, *C. guttatus* e *C. fernandoi*.

Para 16S, a matriz de dados foi dividida em oito grupos: o grupo referente a *C. insignis* e *C. guttatus*, representado pelo clado amarelo na filogenia, foi dividido em dois grupos. O terceiro grupo compreendeu *C. venezuelensis*, o quarto foi composto por *C. impusilloides* e os grupos 5, 6, 7 e 8 foram formados por *C. supurius*, *C. fernandoi* (espécime 13), *C. pusilloides* e *C. caridei*, respectivamente.

DISCUSSÃO

A técnica do DNA Barcode é uma excelente ferramenta tanto para a identificação de espécies já descritas quanto para a descrição de espécies novas. Quando associado à análise morfológica, esta ferramenta pode fornecer informações importantes acerca da precisão do uso dos caracteres morfológicos diagnósticos utilizados para a identificação das espécies. No caso de *Culicoides*, as manchas e máculas das asas costumam ser utilizadas para a identificação a nível de espécie (Wirth & Spinelli, 1988). Esta foi também a estratégia empregada neste artigo, embora em alguns casos caracteres da morfologia externa e interna dos espécimes também tenham sido utilizados. A partir disso, diversas incongruências foram verificadas entre a identificação morfológica e a identificação molecular. De fato, entre as oito espécies que tiveram mais de um indivíduo amostrado, apenas duas revelaram-se monofiléticas: *C. bambusicola* e *C. impusilloides*. Por outro lado, *C. insignis* e *C. irwini/C. guttatus* se revelaram parafiléticas, enquanto as outras três espécies se revelaram polifiléticas. Este foi o caso, por exemplo, de *C. fernandoi*, onde um espécime

agrupou com *C. insignis* e *C. guttatus* no clado amarelo, enquanto o outro espécime posicionou-se como um ramo independente em todas as análises. Outros dois casos semelhantes ocorreram com *C. venezuelensis* (subgênero *Psychophaena*) e *C. alvarezi*, espécies que demonstraram a presença de diversidade críptica sob o mesmo morfotipo geral. Este tipo de incongruência de identificação já foi relatada para *Culicoides* no estudo de Talavera et al. (2017), que revelou a existência de diversidade críptica em *Culicoides pulicaris*, então subdividida em outras duas espécies: *Culicoides cryptipulicaris* e *Culicoides quasipulicaris*.

No caso de *C. fernandoi*, as outras duas espécies que compõem com ela a linhagem amarela (*C. insignis* e *C. guttatus*) pertencem ao mesmo agrupamento de espécies, o subgênero *Hoffmania*. Estas três espécies possuem grande semelhança no padrão de manchas das asas, que constitui o principal caracter utilizado para diferenciar as espécies (Wirth & Spinelli, 1988). Neste sentido, é possível questionar a utilidade deste caracter na diferenciação entre as espécies de *Hoffmania*. De fato, ao invés de três espécies, é bastante provável que estejamos trabalhando aqui com apenas uma espécie de *Hoffmania*, e que os morfotipos descritos por Wirth & Spinelli (1988) para *C. insignis*, *C. guttatus* e *C. fernandoi* representem variantes de uma única espécie. Por outro lado, sob o morfotipo de *C. fernandoi* foi possível revelar uma linhagem geneticamente distinta, que apresenta uma divergência de aproximadamente 1.49% para com a sequência de COI caracterizada para o outro espécime com o mesmo morfotipo. Por fim, embora Fujisawa et al. (2021) tenham apresentado *Hoffmania* como um agrupamento parafilético com relação a espécies Tailandesas, as características distintivas apresentadas por Fox (1948) para o subgênero parecem ser importantes na classificação das espécies Neotropicais. De fato, independentemente do status taxonômico e do nível de subdivisão, as linhagens aqui amostradas para o subgênero revelaram-se reciprocamente monofiléticas com relação às demais.

No entanto, o mesmo não aconteceu com relação ao subgênero *Avaritia*, para o qual o agrupamento entre *C. impusilloides* e *C. pusilloides* não foi recuperado para nenhum dos três marcadores. No caso de COI, ambas espécies ficaram situadas em uma politomia no grande clado incluindo todas as espécies (exceto aquelas pertencentes ao subgênero *Hoffmania*). Para o gene nuclear, *C. pusilloides* apareceu como espécie irmã de um agrupamento incluindo *C. impusilloides*, *C. venezuelensis* e *C. spurius*. Já para 16S, a maioria das linhagens foram representadas por politomias, embora *C. impusilloides* tenha agrupado com baixo suporte com único representante amostrado do subgênero *Haematomyidium*, representado aqui por *C. spurius*. A parafilia de *Avaritia* vai de encontro aos resultados obtidos por Bakhoun et al. (2018), que, em seu estudo de DNA Barcode de *Culicoides* recuperaram a monofilia deste subgênero. No entanto, é importante destacar que as espécies aqui estudadas (*C. pusilloides* e *C. impusilloides*) não foram incluídas nas análises deste estudo, e que a parafilia aqui encontrada para o subgênero está entre os resultados mais pobremente suportados em nossas filogenias.

O subgênero *Cotocripus*, representado aqui por *C. caridei*, *C. bambusicola* e *C. irwini*, por outro lado, revelou-se parafilético nas análises de COI e 28S com relação a *C. alvarezi* que pertence ao grupo *stigmalis* (sem subgênero definido). A sugestão aqui seria, após análises mais robustas e com a inclusão de mais espécies e marcadores, incluir de *C. alvarezi* no subgênero *Cotocripus*. No entanto, a situação parece um pouco mais complexa, já que *C. alvarezi* também revelou-se polifilética, com alguns espécimes apresentando sequências extremamente semelhantes a *C. irwini*, enquanto outros são geneticamente diferenciados dos demais. Mais uma vez, este resultado coloca em cheque a utilização dos padrões de manchas na identificação de espécies de *Culicoides*, ao revelar, em alguns casos, níveis pronunciados de diferenciação genética entre espécimes com morfotipo similar, contrastada pela uniformidade genética encontrada em outros casos para espécimes com morfotipos distintos.

Embora os resultados recuperados sob a perspectiva de DNA Barcoding possam e devam ser considerados sob aspectos mais inclusivos e integrativos, é importante ressaltar que alguns cuidados importantes foram tomados no sentido de minimizar os artefatos potencialmente relacionados à técnica. Entre estes, podemos destacar a possibilidade de co-amplificação de pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMTs), que poderia levar a uma superestimativa do número de espécies (Song et al., 2008; Vyskočilová et al., 2018; Tay et al., 2017) ou o fenômeno de *incomplete lineage sorting* que leva ao compartilhamento de haplótipos ancestrais polimórficos entre espécies que divergiram recentemente (Rêgo, 2010). No entanto, como um dos principais resultados de ambos fenômenos consiste na incongruência entre resultados obtidos para diferentes marcadores, a similaridade nos resultados recuperados aqui para os três genes empregados [dois mitocondriais (COI e 16S rRNA) e um nuclear (28S rRNA)], adiciona confiança aos nossos resultados. De fato, apesar de que algumas espécies analisadas com COI e 28S não tenham sido inclusas nas análises de 16S (como *C. bambusicola*, *C. beaveri*, *C. irwini* e *C. alvarezi*), as espécies inclusas nas três análises mostraram resultados muito semelhantes, embora com resoluções diferentes devido às diferentes taxas evolutivas entre os marcadores (Mueller, 2006).

Por fim, seguindo os resultados aqui apresentados, sugerimos uma revisão nos caracteres morfológicos empregados para a identificação de espécies de *Culicoides*, principalmente aqueles que se referem aos padrões de manchas das asas. De fato, nossos resultados sugerem que este tipo de caracter não constitui a escolha adequada para a identificação e descrição de espécies do gênero, de forma que sinapomorfias e autapomorfias úteis na delimitação de grupos e espécies, respectivamente, ainda permanecem por ser descobertas. Para as espécies do subgênero *Hoffmania*, por exemplo, a diagnose por meio das máculas das asas sugeriu a presença de três morfotipos que não apresentaram diferenças moleculares compatíveis com a presença de três

espécies. Por outro lado, para *C. alvarezi*, *C. fernandoi* e *C. venezuelensis*, níveis crípticos de diversidade foram encontrados sob o mesmo morfotipo geral. Assim, o padrão de máculas nas asas certamente constitui um carácter alvo de amplos níveis de canalização (como nas “espécies” polifiléticas) e plasticidade (como nas espécies “parafileticas”), que precisam ser adequadamente compreendidos. Afinal, a correta identificação das espécies de *Culicoides* é de extrema importância, tanto devido aos prejuízos veterinários e econômicos, quanto pela possibilidade de danos à saúde humana. Apenas com o uso destas informações será possível realizar um plano de controle destas espécies, para que as doenças como *Bluetongue* e Oropouche sejam controladas e não causem epidemias como aquelas que ocorreram entre 1961 e 1978 no Pará, e nem prejuízos econômicos como o embargo da carne ou do animal vivo para o exterior.

REFERÊNCIAS

- ABGD Web. 2021. Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. <<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>> 10nd September 2021.
- Augot, D., Mathieu, B., Hadj-Henni, L., Barriel, V., Mena, S.Z., Smolis, S., Slama, D., Randrianambinintsoa, F.J., Trueba, G., Kaltenbach, M., Rahola, N., Depaquit, J. 2017. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continentes. *Parasite*, 24.
- Bakhoun, M. T.; Sarr, M., Fall, A. G.; Huber, K.; Fall, M.; Sembène, M.; Seck, M. T.; Labuschagne, K.; Gardès, L.; Ciss, M.; Gimonneau, G.; Bouyer, J.; Baldet, T.; Garros, C. DNA barcoding and molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the Niayes area of Senegal. *Parasites & Vectors*, 11 (615), 2018.
- Bandelt, H.J., Forster, P & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Barber, J., Harrup, L.E., Silk, R., Veronesi, E., Gubbins, S., Bachanek-Bankowska, K., Carpenter, S. 2018. Blood-feeding, susceptibility to infection with Schmallenberg virus and phylogenetics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Parasites & Vectors*, 11, 116-128.
- Borkent A, Spinelli GR, 2007. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM, Aquatic biodiversity in Latin America, Pensoft, Sofia-Moscow 4: 198 pp.

- Borkent, A. 2012. The pupae of Culicomorpha—morphology and a new phylogenetic tree. *Zootaxa*, 3396, 1–98.
- Castellón, E.G. and R.S. Veras (eds.). Maruins (Culicoides: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira, Manaus, Editora INPA, 144pp.
- Cognato, A.I. & Vogler, A.P. 2001. Exploring data interaction and nucleotide alignment in a multiple gene analysis of *Ips* (Coleoptera: Scolytinae). *Systematic Biology*, 50, 758–780.
- Daglio, L. G., Dawson, M. 2019. Integrative taxonomy: Ghosts of past, present and future. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(6), 1237–246.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Capiroli, M., Melone, G., Ricci, C. & Barraclough, T.G. 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology*, 5, e87.
- Fujisawa, T. & Barraclough, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, **62**, 707–724.
- Fujisawa, Y., Homat, T., Thepparat, A., Changbunjong, T., Sutummaporn, K., Kornmatitsuk, S., Kornmatitsuk, B. 2021. DNA barcode identification and molecular detection of bluetongue virus in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from western Thailand. *Acta Tropica*, 224.
- Harrup, L. E., Laban, S., Purse, B. V., Reddy, Y. K., Reddy, Y. N., Byregowda, S. M. 2016. DNA barcoding and surveillance sampling strategies for *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern India. *Parasites & Vectors*, 9(1).

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA Barcode reveal cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101, 14812-14817.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313-321.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology*, 2, e312

Hillis e Dixon, 1991

Hillis, D. M., Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic inference. *The quarterly review of Biology*, 66(4), 411-453.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755. Li et al., 1981

Jomkumsing, P., Surapinit, A., Saengpara, T., Pramual, P. 2021. Genetic variation, DNA barcoding and blood meal identification of *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Thailand. *Acta Tropica*, 217, 105866. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105866>.

Joshi, J., Agarwal, I. 2021. Integrative Taxonomy in the Indian Subcontinent: Current Progress and Prospects. *Journal of the Indian Institute of Science*, 101(2), 125–149.

Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Soriguer, R. 2015. Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends in Parasitology*, 31, 16-22.

Mueller, R. L. 2006. Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 55, 289–300.

National Center for Biotechnology Information. 2021. The National Center for Biotechnology Information. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> 15nd September 2021

Nylander, J.A., 2004. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Center, Uppsala University.

Pagès, N., Munõz-Munõz, N., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C., Núñez, J. I. 2009. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology*, 165, 298–310.

Pinheiro, F. P.; Rosa, A. P. A. T.; Da Rosa, J. F. S. T.; da Ishak, R.; Freitas, R. B.; Gomes, M. L. C.; Leduc, J. W.; Oliva, O. F. P. 1981. Oropouche Virus. I. A Review of clinical, Epidemiological., and ecological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(1), 149-160.

Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazel, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595–609.

R Development Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. Available at: R. Foundation for Statistical Computing, Version 4.0.2. <https://www.Rproject.org/>.

Rêgo, P. S. Análise da variabilidade genética e estudo populacional de *Antilophia bokermanni* (Aves: Pipridae) com implicações para sua conservação. Tese de doutorado, 2010.

Rot, A., Meiswinkel, R., Fleker, M., Blum, S.E., Behar, A. 2020. Towards modernizing the taxonomy of Mediterranean *Culicoides* using classical morphology, mtDNA barcoding, and MALDI-TOF MS protein profiling. *Acta Tropica*, 211.

- Rovid, A. 2015. Peste Equina Africana. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Ricardo, M. 2019. Disponível em <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets-pt.php?lang=pt>.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486-13491.
- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233-241.
- Talavera, S.,f. Muñoz-Muñoz, F., Verdún, M., Pagès, N. 2017. Morphology and DNA barcoding reveal three species in one: description of *Culicoides cryptipulicaris* sp. nov. and *Culicoides quasipulicaris* sp. nov. in the subgenus *Culicoides*. *Medical and Veterinary Entomology*, 31, 178–191.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tay, W.T., Elfekih, S.,Court1, L.N., Gordon, K.H.J., Delatte, H., De Barro, P.J. 2017. The Trouble withMEAM2: Implications of Pseudogenes on Species Delimitation in the Globally Invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Cryptic Species Complex. *Genome Biology and Evolution*, 9(10),2732–2738.
- Videvall, E., Bensch, S., Ander, M., Chirico, J., Sigvald, R., Ignell, R. 2013. Molecular identification of bloodmeals and species composition in *Culicoides* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 104–112.

Vyskočilová¹, S., Tay, W.T., Brunschot¹, S., Seal¹, S., Colvin, J. 2018. An integrative approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* whitefly species complex. Scientific Reports, Scientific Repor, 8(10886).

Wirth, W. W.; Dyce, A. L.; Spinelli, G. R. 1988. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Contributions of the American Entomological Institute. 25: 1-72.

Wirth, W.W., Marston, N. 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Annals of Entomological. Society of America*, 61, 783-784.

Yassin, A., Capy, P., Madi-Ravazzi, L. Ogereau,, D., David, J. R. 2008. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. *Molecular Ecology Resources*, 8, 491-501.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Espécies e pontos de coleta de *Culicoides*.

Amostra	Espécie	Sexo	Ponto de Coleta	Data de Coleta	Números de Acesso GenBank		
					COI	16S	28S
1	<i>C. insignis</i>	macho	Santa vitória do Palmar	22/03/2018	OL619958	OL621947	OL621985
2	<i>C. insignis</i>	macho	Santa vitória do Palmar	22/03/2018	OL619959	-	OL621984
3	<i>C. insignis</i>	macho	Santa vitória do Palmar	22/03/2018	OL619960	OL621955	OL621990
4	<i>C. caridei</i>	macho	SJN - Barranco	23/10/2017	OL619942	OL621973	OL621975
5	<i>C. insignis</i>	macho	Bolaxa	02/02/2018	OL619961	OL621951	OL621992
6	<i>C. insignis</i>	macho	Bolaxa	02/02/2018	OL619962	OL621956	OL621993
7	<i>C. insignis</i>	macho	SJN - Barranco	23/10/2017	OL619963	OL621952	OL621994
8	<i>C. insignis</i>	fêmea	Horizontina	23/03/2019	OL619964	OL621954	OL621995
9	<i>C. insignis</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619965	OL621953	OL621996
10	<i>C. bambusicola</i>	fêmea	Cassino - Fazenda Ronaldo	20/02/2018	OL619979	-	OL622009
11	<i>C. bambusicola</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619980	-	OL622010
12	<i>C. spurius</i>	macho	RG - Taim	30/01/2018	OL619943	OL621946	OL621976
13	<i>C. fernandoi</i>	fêmea	Santa Maria	14/03/2019	OL619977	OL621962	OL622007
14	<i>C. irwini</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619953	-	OL621977
15	<i>C. irwini</i>	fêmea	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619954	-	OL621978
16	<i>C. venezulensis</i>	fêmea	Santa vitória do Palmar	24/10/2017	OL619945	OL621963	OL622001
17	<i>C. venezulensis</i>	Fêmea	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619946	OL621964	OL622002
18	<i>C. impusiloides</i>	macho	Horizontina	23/03/2019	OL619992	OL621970	OL621980
19	<i>C. impusiloides</i>	macho	Horizontina	23/03/2019	OL619991	OL621971	OL621981
20	<i>C. venezulensis</i>	fêmea	Santa vitória do Palmar	21/03/2018	OL619947	OL621969	OL622005
21	<i>C. insignis</i>	macho	Santa vitória do Palmar	19/03/2018	OL619966	OL621948	OL621986
22	<i>C. insignis</i>	macho	Bolaxa	02/02/2018	OL619967	OL621949	OL621987
23	<i>C. insignis</i>	fêmea	Porto Alegre	20/04/2019	OL619968	-	OL621988
24	<i>C. insignis</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619969	-	OL621989
25	<i>C. insignis</i>	macho	RG - Taim	30/01/2018	OL619970	OL621950	OL621991
26	<i>C. insignis</i>	Fêmea	RG - Taim	30/01/2018	OL619971	-	-
27	<i>C. venezulensis</i>	macho	Santa vitória do Palmar	21/03/2018	OL619948	OL621965	OL622003

28	<i>C. venezulensis</i>	macho	Horizontalina	23/03/2019		-	-
29	<i>C. venezulensis</i>	fêmea	RG - Taim	30/01/2018	OL619950	-	OL622004
30	<i>C. venezulensis</i>	fêmea	Santa Maria	14/03/2019	OL619949	OL621966	OL622006
31	<i>C. fernandoi</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619978	-	OL622008
32	<i>C. bambusicola</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619981	-	OL622011
33	<i>C. bambusicola</i>	fêmea	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	-	-	OL622012
34	<i>C. bambusicola</i>	fêmea	Horizontalina	23/03/2019	OL619982	-	OL622013
35	<i>C. bambusicola</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619983	-	OL622014
36	<i>C. irwini</i>	fêmea	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619955	-	OL621979
37	<i>C. irwini</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619956	-	OL621980
38	<i>C. impusiloides</i>	macho	Horizontalina	23/03/2019	OL619990	-	OL621983
39	<i>C. guttatus</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619972	OL621961	OL621997
40	<i>C. guttatus</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619974	OL621957	OL621998
41	<i>C. guttatus</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619973	OL621958	OL621999
42	<i>C. guttatus</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619975	OL621959	OL622000
43	<i>C. beaveri</i>	fêmea	Horizontalina	23/03/2019	OL619944	-	-
44	<i>C. bambusicola</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619984	-	OL622015
45	<i>C. bambusicola</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619985	-	OL622016
46	<i>C. pusilloides</i>	macho	Santa Maria	14/03/2019	OL619993	OL621974	OL622017
47	<i>C. alvarezi</i>	fêmea	Porto Alegre	20/04/2019	OL619988	-	OL622018
48	<i>C. alvarezi</i>	fêmea	Porto Alegre	20/04/2019	OL619987	-	OL622019
49	<i>C. bambusicola</i>	fêmea	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619986	-	-
50	<i>C. irwini</i>	macho	Capão do Leão - Cemitério Parque	30/03/2019	OL619957	-	-
51	<i>C. venezuelensis</i>	fêmea	Santa Maria	14/03/2019	-	-	-
52	<i>C. venezuelensis</i>	fêmea	Santa vitória do Palmar	21/03/2018	OL619952	OL621967	-
53	<i>C. guttatus</i>	macho	Pelotas - Três Vendas	28/03/2019	OL619976	OL621960	-
54	<i>C. venezulelensis</i>	macho	Horizontalina	23/03/2019	OL619951	OL621968	-
55	<i>C. impusilloides</i>	macho	Horizontalina	23/03/2019	OL619989	OL621972	-

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O principal objetivo desta tese foi analisar a diversidade taxonômica e os padrões associados a evolução de espécies de Diptera e Hemiptera da PCRS. Entre as nove ordens de insetos que ocupam ambientes aquáticos, Diptera e Hemiptera estão entre as maiores e mais diversas apresentando uma grande variabilidade no que diz respeito a ecologia, reprodução, ciclos de vida e taxonomia das espécies. Tanto Diptera quanto Hemiptera possuem representantes de difícil identificação morfológica, seja pela escassez de taxonomistas capacitados ou pelas poucas e ambíguas chaves de identificação disponíveis na literatura atualmente. Este problema é agravado para os gêneros *Culicoides* e *Belostoma*, pertencentes as famílias Ceratopogonidae e Belostomatidae, respectivamente.

No caso de *Culicoides*, além da identificação por meio de chaves ser trabalhosa, os principais caracteres diagnósticos levam em consideração as manchas e máculas das asas que podem não ser caracteres diagnósticos adequados para a definição a nível de espécie por serem suscetíveis a alterações relacionadas ao formato e tamanho das asas, que varia entre os sexos. Além disso, há a necessidade de uma ferramenta de identificação rápida e prática para *Culicoides*, pois algumas espécies são vetores de arboviroses que acometem animais e humanos, causando prejuízos médicos, veterinários e econômicos. Logo, uma ferramenta de identificação é fundamental para o manejo dessas espécies. Neste sentido, o artigo intitulado “Diversidade e taxonomia de espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico por meio de DNA Barcode” buscou avaliar a efetividade da ferramenta de DNA Barcode para identificação de espécies Neotropicais de *Culicoides*, tentando fornecer alguns insights acerca de suas relações filogenéticas. Para tanto, 55 indivíduos tiveram suas sequências determinadas para dois genes mitocondriais (COI e 16S) e um gene nuclear (18S), e as matrizes gênicas obtidas foram analisadas sob enfoques filogenéticos, de distância e de coalescência. Neste trabalho, os resultados demonstraram a presença de 12 linhagens, entre as quais o agrupamento entre as espécies *Culicoides insignis*, *Culicoides guttatus* e *Culicoides fernandoi* foi recuperado como uma linhagem independente para todas as análises com todos os marcadores. Podemos sugerir aqui que estas três espécies provavelmente pertencem a uma única espécie com plasticidade fenotípica e que as diferenças nas manchas das asas utilizadas para identificação de cada uma das espécies representem variações intraespecíficas. Por outro lado, *C. alvarezi*, *C. fernandoi* e *C. venezuelensis*

revelaram-se polifiléticas, demonstrando a presença de níveis crípticos de diversidade. Os agrupamentos apresentaram alto suporte e todos os clados apresentaram *barcoding gap* em todas as análises sugerindo que o DNA Barcode seja uma excelente ferramenta para identificação e até mesmo delimitação de espécies novas de *Culicoides*. Outros trabalhos já avaliaram a aplicabilidade da ferramenta de DNA Barcode neste gênero (BAKHOUM et al., 2018; HARRUP et al., 2016; TALAVERA et al., 2017; FUJISAWA et al., 2021; SNYMAN et al., 2021), porém não há registros de trabalhos que incluam as espécies presentes na planície costeira, tornando este trabalho inédito.

A mesma ferramenta também foi utilizada no artigo intitulado “Disentangling the taxonomy of *Belostoma* Latreille (Hemiptera, Heteroptera, Belostomatidae) with the aid of DNA barcoding approaches” e publicado na Austral Entomology. Neste trabalho foram incluídas todas as espécies que possuíam sequências disponíveis nos bancos de dados GenBank/NCBI (NCBI, 2021) e BOLD, além de 181 e 164 sequências novas dos genes mitocondriais COI e 16S caracterizadas para as espécies coletadas ao longo da PCRS. A matriz de dados foi dividida em 10 clados, seis dos quais revelaram a monofilia recíproca de espécies previamente descritas (*B. angustum*, *B. cummingsi*, *B. dentatum*, *B. noualhieri*, *B. orbiculatum* e *B. ribeiroi*), um que sugeriu a presença de uma potencial espécie nova e outros três que revelaram alguma inconsistência com a taxonomia. Dentre os últimos, um clado revelou-se particularmente diverso ao incluir nove morfotipos: três de espécies já descritas (*Belostoma sanctulum*, *Belostoma horvathi* e *Belostoma candidulum*), dois morfotipos com morfologia interna masculina semelhantes a *B. horvathi* e *B. sanctulum* (denominadas aqui como “*aff.*”), mais três morfotipos que apresentaram morfologia interna masculina diferente daquelas encontradas nas chaves de identificação disponíveis na literatura, denominadas aqui como *Belostoma* sp. 1, *Belostoma* sp. 2 e *Belostoma* sp. 3 e fêmeas pertencentes ao grupo *oxyurum*, mas que não puderam ser identificadas a nível de espécie. Assim, neste artigo, o DNA barcoding se revelou uma excelente ferramenta não apenas para a identificação de espécies de *Belostoma*, como também para revelar inconsistências na taxonomia do grupo e delimitar potenciais espécies novas. Além disso, este é o primeiro trabalho que analisa as relações filogenéticas dentro do gênero *Belostoma*, pois o único estudo tratando das relações filogenéticas em Belostomatidae (RIBEIRO et al. 2017) não explorou as relações dentro do gênero e sim dentro da família.

Em ambos trabalhos, além de COI, considerado o marcador clássico para a técnica de DNA Barcode (HERBERT et al., 2003), utilizamos sequências de outros marcadores (16S e 18S, no caso de *Culicoides*; 16S apenas no caso de *Belostoma*). Estes outros genes foram utilizadas como controle na avaliação da possibilidade de co-amplificação de artefatos (NUMTs) (SONG et al., 2008; VYSKOČILOVÁ et al., 2018; TAY et al., 2017), que poderiam levar a uma superestimativa do número de espécies. Em ambos os casos, no entanto, esta possibilidade pode ser rejeitada devido à ausência de incongruência entre os marcadores. Assim, embora ambos artigos demonstrem a importância do DNA Barcode como ferramenta para a identificação de espécies de *Culicoides* e *Belostoma* e para a delimitação de espécies potencialmente novas, eles também enfatizam a necessidade de associação de técnicas de identificação molecular à identificação morfológica, e de utilizar pelo menos dois marcadores moleculares nos trabalhos de taxonomia molecular. Ambos trabalhos também demonstram a importância do uso de métodos analíticos com pressupostos distintos nas análises envolvendo DNA Barcoding. Afinal, a congruência entre os resultados obtidos sob o uso de diferentes enfoques (como o filogenético, de distância ou de coalescência) demonstram a robustez dos dados, e permitem a atribuição de maiores níveis de confiabilidade aos resultados obtidos.

Para o gênero *Belostoma*, esta tese também inclui um capítulo adicional, mais voltado para análises de genética de populações. O artigo intitulado “Population structure of *Belostoma angustum* (*Belostoma*: Belostomatidae) across different geomorphological units of the Brazilian Pampa Biome” buscou analisar a estruturação populacional de uma espécie de *Belostoma* nas diferentes regiões geomorfológicas do Bioma Pampa procurando compreender os níveis de dispersão da espécie e como as diferenças de altitude entre as regiões geomorfológicas influenciam nesse processo. A espécie alvo do deste estudo, *B. angustum*, apresenta uma alta capacidade de dispersão (RIBEIRO comunicação pessoal), migrando de acordo com as condições ambientais de cada local. Neste sentido, um trabalho recente (STEFANELLO et al., 2019) demonstrou a presença de uma população panmítica em diferentes regiões interiores ao Bioma Pampa. Ao comparar estas populações com nossas amostras coletadas na PCRS, no entanto, recuperamos sinais significativos de estruturação populacional para os três marcadores empregados neste estudo (COI, 16S e 18S). Este resultado sugere que as diferenças de altitude entre a PCRS e as regiões interiores, especialmente a Serra do Sudeste, pode representar uma barreira a dispersão e ao fluxo gênico de *B. angustum*. No entanto, os resultados também recuperaram sinais de expansão populacional a

partir de uma região restrita PCRS para regiões mais interiores, o que sugere que os níveis de estruturação populacional por nós encontrados podem ser um reflexo isolado da história demográfica da espécie. Por isso, este trabalho pode não apenas lançar luz à possibilidade de estruturação populacional e posterior especiação de *B. angustum*, como também evidenciar cenários espaço-temporais potencialmente relacionados a diversificação de outros táxons de insetos associados a ambientes aquáticos ao longo do Bioma Pampa.

Por fim, destacamos entre as principais contribuições desta tese: 1) evidenciar importantes inconsistências taxonômicas em *Culicoides* e em *Belostoma*, 2) demonstrar a utilidade e a efetividade da técnica de DNA Barcode em ambos os gêneros; 3) auxiliar na definição das relações filogenéticas dos dois grupos estudados; 4) lançar luz ao status de distribuição, à história demográfica e à capacidade de dispersão de *B. angustum*. No entanto, inúmeros novos desafios e questionamentos surgiram. Entre eles, podem-se citar como principais perspectivas futuras desta tese:

- A análise morfológica detalhada e redefinição dos caracteres morfológicos diagnósticos internos para o gênero *Belostoma*, principalmente no que diz respeito as espécies inclusas no clado amarelo do primeiro artigo.
- A análise morfológica dos caracteres internos femininos de *Belostoma* a fim de incluí-los em chaves de identificação, já que as chaves disponíveis atualmente na literatura se referem exclusivamente a caracteres morfológicos internos masculinos, muitas vezes impossibilitando a identificação a nível de espécie das fêmeas;
- Incluir novos pontos de coleta de *B. angustum*, principalmente na PCRS, a fim de comparar com maior robustez o sinal de estruturação populacional dessa região frente a cada uma das unidades geomorfológicas do Bioma Pampa;
- Incluir um número maior de espécies com sequências disponíveis em bancos de dados para uma análise mais robusta do DNA Barcoding como ferramenta de identificação molecular de *Culicoides*;
- Ampliar o número de espécies e marcadores utilizados em ambos os estudos a fim de propor uma hipótese mais robusta acerca das relações filogenéticas entre espécies dos dois gêneros e ao cenário evolutivo associado à sua diversificação.

REFERÊNCIAS

- BAKHOUM, M. T.; SARR, M., FALL, A. G.; HUBER, K.; FALL, M.; SEMBÈNE, M.; SECK, M. T.; LABUSCHAGNE, K.; GARDÈS, L.; CISS, M.; GIMONNEAU, G.; BOUYER, J.; BALDET, T.; GARROS, C. DNA barcoding and molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the Niayes area of Senegal. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 615, 2018.
- FUJISAWA, Y.; HOMAT, T.; THEPPARAT, A.; CHANGBUNJONG, T.; SUTUMMAPORN, K.; KORNMATITSUK, S.; KORNMATITSUK, B. DNA barcode identification and molecular detection of bluetongue virus in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from western Thailand. **Acta Tropica**, v. 224, 2021.
- HARRUP, L. E.; LABAN, S.; PURSE, B. V.; REDDY, Y. K.; REDDY, Y. N.; BYREGOWDA, S. M. DNA barcoding and surveillance sampling strategies for *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern India. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2021. The National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- RIBEIRO, J. R. I.; OHBA, S.; PLUOT-SIGWALT, D.; STEFANELLO, F.; BU, W.; MEYIN-ABONG, S. E.; GUILBERT, E. Phylogenetic analysis and revision of subfamily classification of Belostomatidae genera (Insecta: Heteroptera: Nepomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 1-41, 2017.
- SNYMAN, J.; SNYMAN, L. P.; LABUSCHAGNE, K.; VENTER, G. J.; VENTER, M. The utilisation of CytB and COI barcodes for the identification of bloodmeals and *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a variety of novel wildlife hosts in South Africa. **Acta Tropica**, v. 219, 2021.
- SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13486-13491, 2008.
- STEFANELLO, F.; MENEZES, R. S. T.; RIBEIRO, J. R. I.; ALMEIDA, E. A. B. Widespread Gene Flow Model Explains the Genetic– Morphological Variation in a Giant Water Bug Species

Under Fine-Scale Spatial Sampling. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 20, n. 10, p. 1-11, 2019.

TALAVERA, S. F.; MUÑOZ-MUÑOZ, F.; VERDÚN, M.; PAGÈS, N. Morphology and DNA barcoding reveal three species in one: description of *Culicoides cryptipulicaris* sp. nov. and *Culicoides quasipulicaris* sp. nov. in the subgenus *Culicoides*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 178–191, 2017.

TAY, W. T.; ELFEKIH, S.; COURT, L. N.; GORDON, K. H. J.; DELATTE, H.; DE BARRO, P. J. The trouble with MEAM2: implications of pseudogenes on species delimitation in the globally invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species complex. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 10, p. 2732–2738, 2017.

VYSKOČILOVÁ, S.; TAY, W. T.; BRUNSCHOT, S.; SEAL, S.; COLVIN, J. An integrative approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* white-fly species complex. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

ANEXOS

Anexo 1 – Publicações extras produzidas pela discente no período do doutorado

1. GAUTÉRIO, T. B.; MACHADO, S.; LORETO, E. L. S.; GOTTSCHALK, M. S.; ROBE, L. J. Phylogenetic relationships between fungus-associated Neotropical species of the genera *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* and *Zygothrica* (Diptera, Drosophilidae), with insights into the evolution of breeding sites usage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145, p. 106733, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106733>.
2. VIANNA, J. S.; RAMIS, I. B.; SILVA JUNIOR, L. V.; HALICKI, P. C. B.; GAUTERIO, T. B.; VON GROLL, A.; SILVA, P. E. A.; GIOIA, C. A. C. *Helicobacter pylori* infection and associated factors. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 9, p. 100-102, 2019. <https://doi.org/10.17058/reci.v9i1.11909>.
3. FINET, C.; KASSNER, V. A.; CARVALHO, A. B.; CHUNG, H.; DAY, J. P.; DAY, S.; DELANEY, E. K.; DE RÉ, F. C.; DUFOUR, H. D.; DUPIM, E.; IZUMITANI, H. F.; GAUTÉRIO, T. B.; JUSTEN, J.; KATOH, T.; KOPP, A.; KOSHIKAWA, S.; LONGDON, B.; LORETO, E. L.; NUNES, M. D. S.; RAJA, K. K. B.; REBEIZ, M.; RITCHIE, M. G.; SAAKYAN, G.; SNEDDON, T.; TERAMOTO, M.; TYUKMAEVA, V.; VANDERLINDE, T.; WEY, E. E.; WERNER, T.; WILLIAMS, T. M.; ROBE, L. J.; TODA, M. J.; MARLÉTAZ, F. DrosoPhyla: resources for Drosophilid Phylogeny and Systematics. *Genome Biology and Evolution*, 13, 2021. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab179>.

Anexo 2 – Certidões de Cadastro de Acesso para as espécies utilizadas no presente trabalho emitidas pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – CGEN/SISGEN.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO
TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão Cadastro nº A85CDD7

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A85CDD7**
Usuário: **Universidade Federal do Rio Grande - FURG**
CPF/CNPJ: **94.877.586/0001-10**
Objeto do Acesso: **Patrimônio GenéticoPesquisa**
Finalidade do Acesso:

Espécie

Belostoma sp.

Título da Atividade: **Estrutura Populacional de Heterópteros Aquáticos (Hemiptera) na Planície Costeira do Sul do Brasil**

Equipe

Augusto Ferrari	Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Lizandra Jaqueline Rober	Universidade Federal de Santa Maria
Thaísa Bozzetti Gautério	Universidade Federal do Rio Grande
Kim Ribeiro Barão	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Envios de Amostra

Espécie: Sede da Instituição Destinatária:
Tipo do Patrimônio Genético:
Forma do Patrimônio Genético:
Instituição Destinatária:

Hypoponera sp

Amostra líquida em tubo de microcentrífuga (eppendorf)Macrogen Inc.

-

908 World Meridian Venture Center, Seoul, Geumchun-gu, 82221137100, Coreia do Sul

Data do Cadastro:

30/07/2018 15:32:05

Situação do Cadastro:

Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:58** de **12/11/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão Cadastro nº A02F6A4

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A02F6A4**
Usuário: **UFSM**
CPF/CNPJ: **95.591.764/0001-05**
Objeto do Acesso: **Patrimônio GenéticoPesquisa**
Finalidade do Acesso:

Espécie

Culicoides alvarezi
Culicoides bambusicola
Culicoides bambusicola aff.
Culicoides beaveri Culicoides
caridei Culicoides fernandoi
Culicoides guttatus Culicoides
impusiloides Culicoides insignis
Culicoides irwini
Culicoides pusilloides
Culicoides spurius Culicoides
venezulensis

Título da Atividade: **Diversidade e taxonomia de espécies de Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) no Neotrópico avaliadas por DNA Barcode**

Equipe

Thaísa Bozzetti Gauterio	Universidade Federal do Rio Grande
Lizandra Jaqueline Robe	Universidade Federal de Santa Maria
Daiane Carrasco Chaves	Universidade Federal do Rio Grande

Envios de Amostra

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético: Forma do Patrimônio Genético:Instituição Destinatária:

Culicoides alvarezi

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Forma do Patrimônio Genético:

Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária:

908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumcheon-g
Espécie:

Tipo do Patrimônio Genético:

Culicoides bambusicola

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides bambusicola aff.

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides beaveri

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides caridei

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides fernandoi

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides guttatus

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides impulsiloides

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides insignis

-

Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)Macrogen Inc.**908 World Meridian Venture Center #60-24 Gasan-dong Geumchun-gu, Seoul, Geumchun-gu**
Culicoides irwini

-

Data do Cadastro: **17/02/2021 15:27:02**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:02** de **12/11/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**