

Diversidad genética de los chinches de agua (Heteroptera: Gerromorpha, Nepomorpha) presentes en el plano inundable del Magdalena Medio, Colombia

Genetic diversity of water bugs (Heteroptera: Gerromorpha, Nepomorpha) present in the floodplain of the Magdalena Medio, Colombia

Ana Niño-Paipilla ¹, Andrés Gómez-Palacio ¹, Irina Morales  ^{2*}

- Recibido: 14/Mar/2023
- Aceptado: 27/Ago/2024
- Publicación en línea: 08/Oct/2024

Citación: Niño-Paipilla A, Gómez-Palacio A, Morales I. 2024. Diversidad genética de los chinches de agua (Heteroptera: Gerromorpha, Nepomorpha) presentes en el plano inundable del Magdalena Medio, Colombia. Caldasia 46(3):517-527. doi: <https://doi.org/10.15446/caldasia.v46n3.105754>

RESUMEN

La diversidad genética es una condición básica que determina cómo las especies mantienen sus funciones metabólicas en diversos ecosistemas. Los ecosistemas acuáticos, se enfrentan a diferentes problemáticas, que ponen en riesgo la diversidad genética de varios grupos taxonómicos como los insectos acuáticos, que desempeñan un importante papel ecológico en estos ambientes. El objetivo de esta investigación fue analizar la diversidad genética de chinches acuáticos y semiacuáticos en un sistema cenagoso de la cuenca media del río Magdalena. Se realizó trabajo de campo y se recolectaron los ejemplares mediante barridos con una red entomológica acuática tipo D, en el laboratorio se realizó un análisis de la subunidad 1 del gen Citocromo Oxidasa (COI). Se identificaron 29 ejemplares con la información disponible en el *Barcode of Life Data System* (BOLD) y GenBank, y se estimaron las distancias y las relaciones genéticas entre Gerromorpha y Nepomorpha. Para el infraorden Gerromorpha se identificaron tres especies, una especie no descrita de *Metrobates* sp. y once morfotipos agrupados en nueve géneros de cuatro familias y para Nepomorpha se identificó una especie no descrita y tres morfotipos agrupados en tres géneros de la familia Notonectidae. Se obtuvo un nuevo registro del COI para *Ovatametra obesa* en Colombia. Las distancias genéticas variaron desde 0,05 hasta 0,29 para Gerromorpha y para Nepomorpha los valores fueron menores a 0,24. La alta variación identificada para Gerromorpha y Nepomorpha resalta la diversidad de esta entomofauna presente en la ciénaga, y demuestra la resiliencia ecológica de estos grupos frente a la intervención antrópica.

Palabras clave: Boyacá, código de barras de ADN, distancias genéticas, Gen COI, Heterópteros acuáticos.

¹ Laboratorio de Investigación en Genética Evolutiva, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá, Colombia.

² Laboratorio de Entomología, Grupo de investigación Biodiversidad y Conservación, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá, Colombia. irina.morales@uptc.edu.co

* Autor para correspondencia.



ABSTRACT

Genetic diversity is a critical factor for species' survival across diverse ecosystems. Still, aquatic systems face significant threats that can undermine this diversity, particularly among key taxonomic groups like aquatic insects. This study investigated the genetic diversity of aquatic and semi-aquatic bugs in a wetland system within the middle Magdalena River basin. Specimens were collected using a D-type aquatic entomological net and analyzed for the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene. Twenty-nine specimens were identified using data from the Barcode of Life Data System (BOLD) and GenBank, with estimated genetic distances and relationships between Gerromorpha and Nepomorpha estimated. For Gerromorpha, three species were identified, including one new species of *Metrobates* sp., and eleven morphotypes distributed across nine genera and four families. For Nepomorpha, one new species was recognized along with three morphotypes classified into three genera within the family Notonectidae. Additionally, a new COI record for *Ovatametra obesa* was established in Colombia. Genetic distances ranged from 0.05 to 0.29 for Gerromorpha and were less than 0.24 for Nepomorpha. The significant genetic variation observed highlights the diversity of the entomofauna in the wetland and reflects the ecological resilience of these groups amidst anthropogenic pressures.

Keywords: Aquatic heteroptera, Boyacá, DNA Barcode, Gene COI, Genetic distance.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es considerada una condición básica moldeada por la selección natural y por tanto determina como las especies mantienen sus funciones metabólicas (ej. aptitud reproductiva) y su adaptación para responder a los cambios ambientales y garanticen su supervivencia a largo plazo (Frankham *et al.* 2002). El conocimiento sobre la distribución de la diversidad genética dentro de las especies forma parte integral del estudio de la biodiversidad y combinado con el conocimiento sobre la historia de las especies permite la identificación de unidades de conservación (Moritz 1994). Por lo tanto, los resultados del análisis genético y de cuantificaciones de la diversidad genética son cruciales para definir y mejorar estrategias de conservación (Dixon *et al.* 2007; Schwartz *et al.* 2007), principalmente para ecosistemas estratégicos (ej. Las ciénagas) y para grupos focales o bioindicadores como los insectos acuáticos y semiacuáticos.

Las ciénagas, son humedales que presentan grandes problemáticas por actividades humanas tales como vertimientos de aguas servidas, contaminación por metales pesados, el uso incontrolado de fertilizantes, la minería y la exploración de petróleo (Correa-Ayram *et al.*, 2020). Lo que ha causado un fuerte impacto negativo sobre la biodiversidad de estos sistemas acuáticos y pone en riesgo a

muchos grupos taxonómicos de importancia para el equilibrio ecosistémico. La entomofauna acuática representa a uno de estos grupos y se ha documentado que pueden actuar como bioindicadores de la calidad del agua y de la salud del ecosistema acuático (Otálora y Santos 2011, Murillo-Montoya *et al.* 2018).

Los heterópteros acuáticos son considerados uno de los grupos más diversos de insectos con metamorfosis incompleta presentes en todos los continentes, excepto en la Antártida, comprendiendo una diversa gama de hábitats, desde el marino hasta la alta montaña (Polhemus y Polhemus 2008, Carbonell *et al.* 2011, Cordeiro y Moreira 2015, Havemann *et al.* 2018). Entre estos, los que viven en la superficie del agua son conocidos como semiacuáticos (Gerromorpha), mientras que los que viven debajo de la superficie son conocidos como acuáticos (Nepomorpha) (Mazzucconi *et al.* 2009). Estos organismos desempeñan un importante papel ecológico como depredadores, detritívoros o carroñeros (Mazzucconi *et al.* 2009, Koroiva *et al.* 2022).

La región Neotropical es la más rica en especies descritas, el infraorden Gerromorpha comprende ocho familias actualmente reconocidas con 45 géneros y más de 500 especies, mientras que el infraorden Nepomorpha incluye once familias con 52 géneros y aproximadamente 730 especies

(Ye *et al.* 2020), lo que representa alrededor del 29 y 30 % de su diversidad global respectivamente (Moreira 2015, Barbosa y Rodrigues 2015, Moreira *et al.* 2016), no obstante este conocimiento a nivel de la diversidad taxonómica, aún no se cuenta con información detallada sobre la diversidad genética en cuerpos de agua con alta vulnerabilidad por las actividades humanas. En el contexto ecológico, este grupo de insectos domina la fauna de invertebrados en la mayoría de los ecosistemas de agua dulce; sin embargo en cuerpos de agua dulce y hábitats marinos, estos insectos tienen requerimientos específicos como la preferencia por aguas estancadas o de flujo lento, las dimensiones de los cuerpos de agua, el uso de la tierra, la vegetación acuática y ribereña, y la condición fisicoquímica del agua, lo que los hace bioindicadores para determinar la calidad del agua (Castanhole *et al.* 2013, Gligorović *et al.* 2016, Havemann *et al.* 2018, Bakonyi *et al.* 2022, Moy *et al.* 2022). Además, son una parte clave de la cadena trófica debido a su amplia gama de fuentes de alimentación, ya que son depredadores fitófagos, hematófagos y algunos omnívoros, también son presas importantes para numerosos organismos que incluyen peces, aves y anfibios (Carbonell *et al.* 2011, Turić *et al.* 2012, Castanhole *et al.* 2013, Havemann *et al.* 2018).

Se conoce que los infraórdenes Nepomorpha y Gerromorpha habitan cuerpos de agua influenciados por un conjunto de factores ambientales completamente diferentes y que implican atributos fisicoquímicos del agua, y la vegetación presente (Morales-Castaño y Molano-Rendón 2008, Dias-Silva *et al.* 2010, Olosutean *et al.* 2019). En este sentido, es conocido que mientras que el comportamiento de forrajeo de las especies del infraorden Nepomorpha se lleva a cabo mayoritariamente en las zonas bentónicas y nectónicas, que incluyen alta densidad de vegetación acuática, las especies de Gerromorpha son pleustónicas, por lo que son más sensibles a las propiedades de calidad de la superficie del agua (Andersen 1995, Morales-Castaño y Molano-Rendón 2008, Dias-Silva *et al.* 2010, Olosutean *et al.* 2019). Por otro lado, a pesar de que estos infraórdenes presentan numerosas adaptaciones morfológicas y ecológicas, a una escala taxonómica más baja como género y especie, su identificación a menudo se hace difícil como resultado de la vasta morfología críptica y la alta diversidad intraespecífica (Mondragón-Fonseca y Morales-Castaño 2013, Havemann *et al.* 2018, Galindo-Malagón *et al.* 2022). Por lo tanto, la identificación de las especies basada en caracteres morfológicos es compleja, a menudo es necesario acudir a descripciones breves con ilustraciones

erróneas de caracteres y requiere la ayuda de taxónomos experimentados, además de la dificultad de identificar estados inmaduros de las chinches (Havemann *et al.* 2018).

Bajo este panorama, los análisis moleculares que incluyen el código de barras de ADN son muy útiles para proponer y apoyar la identificación de estas especies (Meyin *et al.* 2016), así como, para el estudio de su diversidad y filogenia (Brožek 2014, Wang *et al.* 2016, Meyin *et al.* 2016, Johnson *et al.* 2018). El código de barras de ADN utiliza los datos de las secuencias de nucleótidos del gen de la subunidad I de citocromo oxidasa (COI) y representa sin duda el enfoque más destacado y popular para la identificación genética de las especies y de diversidad genética, ya que permite caracterizar a cada especie mediante un perfil o huella genética única definida por la composición y el orden de los nucleótidos (Park *et al.* 2011, Havemann *et al.* 2018).

En esta investigación se tuvo como objetivo identificar y analizar la diversidad genética de chinches acuáticos y semiacuáticos en un sistema cenagoso de la cuenca media del río Magdalena. Consideramos en este abordaje genético las poblaciones del infraorden Gerromorpha y una familia de Nepomorpha, de las siete con distribución en el área de estudio. Se discuten los resultados en pro de la evaluación de los patrones de diversidad genética y su potencial interés para la conservación de los taxones y del ecosistema cenagoso evaluado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La investigación se desarrolló en el sistema lento de la Ciénaga de Palagua (6.05719004, -74.501436; 151 m) ubicado en la cuenca media del río Magdalena en jurisdicción del municipio de Puerto Boyacá, departamento de Boyacá, en la vertiente occidental de la cordillera Oriental de los Andes de Colombia (Fig. 1). La ciénaga de Palagua está bajo la influencia de la formación de bosque húmedo tropical, en una zona de alta pluviosidad, con un espejo de agua de 192 hectáreas y un área total de 400 hectáreas, localizada a 170 m.s.n.m., presenta un régimen de distribución bimodal, con los períodos de marzo a mayo y septiembre a noviembre como los de mayor precipitación. Entre las especies de la flora, representativas de la ciénaga y que aportan recursos a los insectos se encuentran el Buchón (*Pontederia crassipes* Mart.), Lechuga de

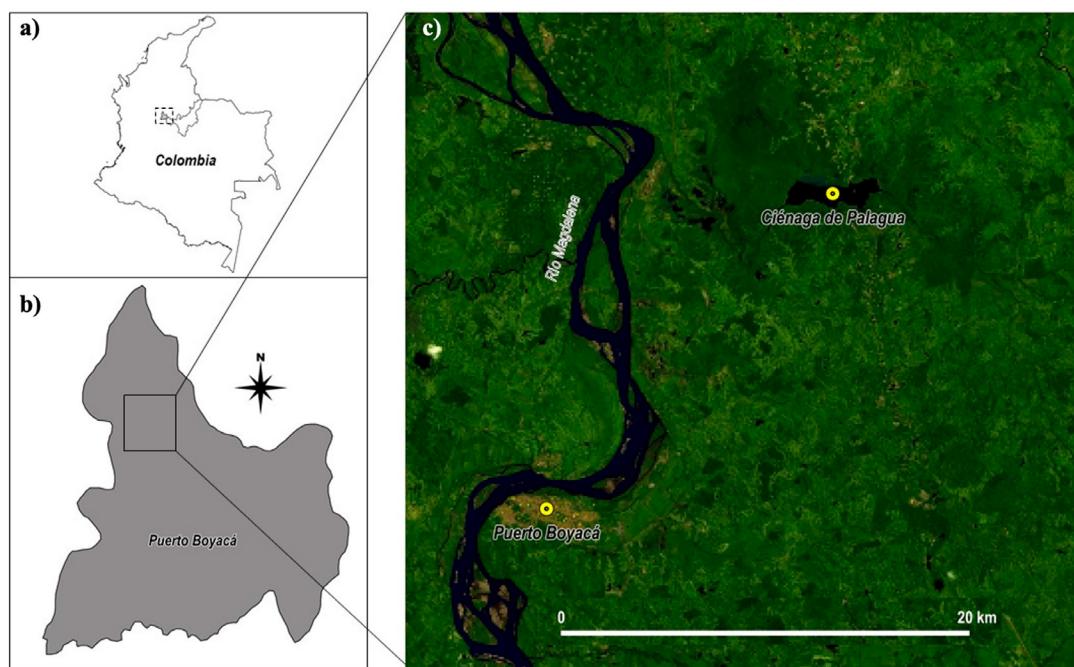


Figura 1. Sitio de muestreo. (a) Mapa de Colombia. (b) Mapa del municipio de Puerto Boyacá y (c) ubicación de la Ciénaga de Palagua, en el plano inundable del Magdalena Medio, Colombia.

agua (*Pistia stratiotes* L.), Helecho de agua (*Salvinia auriculata* Aubl.) y en la zona aledaña se encuentran principalmente gramíneas como *Hymenachne amplexicaulis* (Rudge) Nees, *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc., y *Andropogon bicornis* L. (García y Tapias 2011). Palagua presenta múltiples problemáticas por el vertimiento de aguas servidas, la contaminación con agroquímicos, vertimientos por la explotación de petróleo y por cargas altas de agua contaminada, transferidas por el río Magdalena a través de sus ríos tributarios.

Muestreos

Se realizaron dos muestreos entre septiembre a noviembre de 2019, durante del periodo de mayor precipitación y dos entre enero y marzo de 2020 en el periodo de menor precipitación. La recolección de los ejemplares se realizó mediante barridos con una red entomológica acuática tipo D en todos los microhábitats con potencial presencia de chiches acuáticas: zonas de fuerte corriente y de remanso, zonas protegidas de la luz solar directa y en zonas con vegetación costera (Morales-Castaño y Molano-Rendón 2008; Mondragón-Fonseca y Morales-Castaño 2013). Los especímenes se almacenaron en etanol al 96 % y se identificaron según las claves taxonómicas disponibles y las descripciones originales de Roback y Nieser (1974), Nieser et al. (1993), Polhemus (1997), Nieser y López-Ruf (2001), Estévez y Polhemus (2001), López-Ruf et al. (2003), López-Ruf (2004), Buzzetti y Zettel (2011), Floriano y Cavi-

chioli (2013), Moreira et al. (2011, 2016, 2018), Mondragón et al. (2017).

Se seleccionó un individuo por cada especie o morfotipo para los posteriores análisis moleculares. A cada individuo se le extrajo el tórax y las patas para la extracción de ADN. De aquellos especímenes pequeños (< 3 mm) se utilizó el cuerpo completo de acuerdo con lo expuesto por Havemann et al. (2018).

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Los análisis de ADN se realizaron para quince de las 24 especies del infraorden Gerromorpha y para cuatro de las siete especies del infraorden Nepomorpha, registradas en el área de estudio. Para las especies faltantes no se obtuvieron buenas resoluciones de ADN o para el caso del infraorden Nepomorpha no se obtuvo una buena definición taxonómica, principalmente para las familias Belostomatidae, Nepidae, Notonectidae, Corixidae, Naucoridae y Pleidae, que actualmente presentan pocas claves disponibles y un número bajo de expertos que apoyen la determinación taxonómica necesaria para un correcto uso de las herramientas genéticas.

El ADN genómico se extrajo con el protocolo *Grind Buffer* (Collins et al. 1987), como se ha registrado para otros hemípteros en Colombia (Grisales et al. 2010). Inicialmente el ADN total se resuspendió en agua libre de nucleasas

(Wizard Genomic DNA, Promega®) y posteriormente, la concentración (ng/mL) y la calidad (absorbancia 260/280 nm) del ADN genómico extraído, se realizó en un espectrofotómetro Epoch™ (Microplate Spectrophotometer, BioTek). Finalmente, para evaluar la integridad del ADN se visualizó en una electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con HydraGreen™.

La amplificación del Citocromo c oxidasa subunidad I (COI), se realizó para cada individuo con los conjuntos de cebadores descritos en la (Tabla 1). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 30 µl que contenía 4 µl de ADN total (50 ng/ul), 3 µl de solución tampón 1X (Fermentas®), 0,2 mM de dNTP, 0,4 mM de cada cebador, 3 mM de MgCl₂, 1,2 µg/µl de BSA, 1 UI de Taq polimerasa (Fermentas®) y 15,6 µl de agua estéril tratada en autoclave a. El perfil de amplificación constó de 36 ciclos a 95°C durante 30 s, 42-50°C (según condiciones del cebador) durante 30 s y 72°C durante 1 min, seguidos de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con HydraGreen™ y los amplificados fueron enviados para su purificación y secuenciación a la empresa Macrogen Inc. (www.macrogen.com).

Análisis de secuencias nucleotídicas e identificación por Código de Barras de ADN

Las secuencias sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) de cada ejemplar se ajustaron y alinearon para obtener una secuencia consenso para cada individuo en el programa BioEdit v.7.0.9.0 (Hall 1999). Posteriormente se realizaron los alineamientos múltiples para las espe-

cies o morfotipos de cada infraorden por separado utilizando la opción automática en MAFFT v7.453 (Katoh y Standley 2013).

Para la confirmación taxonómica por Código de Barras, todas las secuencias de COI se sometieron al sistema de Número de Índice del Código de Barras (BIN del inglés *Barcode index number*), implementado en el *Barcode of Life Data System* (BOLD, (Tabla 2)), Ratnasingham y Hebert 2013). Las secuencias ausentes en BOLD se compararon con las presentes en el GenBank con la herramienta Blastn. Las secuencias para los taxones de Gerromorpha y Nepomorpha registradas en este trabajo se depositaron en el GenBank bajo loscódigos OQ324864 - 80 y OQ307811 - 22, respectivamente.

Variabilidad y distancia genética

A partir de los alineamientos múltiples se determinó para cada secuencia el tamaño (pb), la composición nucleotídica (% AT), el número de sitios variables informativos por parsimonia y el porcentaje de variación (sitios únicos variables/tamaño de la secuencia) con el programa MEGA X v. 10. 1 (Kumar et al. 2018). Las distancias genéticas interespecies o morfotipos dentro de cada infraorden fueron calculadas usando el modelo de sustitución de mejor ajuste según el Criterio de Información Bayesiano (BIC del inglés *Bayesian Information Criterion*; Schwarz 1978), como está implementado en el programa MEGA X v. 10. 1 (Kumar et al. 2018). Los valores de desviación estándar fueron calculados usando 1000 réplicas de *Bootstrap*.

Tabla 1. Cebadores de COI usados en especies o morfotipos de Gerromorpha y Nepomorpha presentes en el plano inundable del Magdalena Medio, Colombia.

Iniciador	Secuencia	Temperatura de anidamiento	Referencia
LCO1490	5'-TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'		
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	45°C	Folmer et al., (1994)
jgLCO1490	5'-TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG-3'		
jgHCO2198	5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3'	42°C	Geller et al., (2013)
NANCY	5'-CCCGTAAAATTAAAATATAAATTC-3'		
HETF1	5'-ATGAATTATTCGAATTGAAATAGG-3'	42°C	Simon et al., (1994)
LepF1	5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3'		
LepR1	5'-TAAACTCTGGATGTCCAAAAA-3'	42°C	Hebert et al., (2004)

RESULTADOS

Análisis de secuencias nucleotídicas e identificación por Código de Barras de ADN

Con base en el análisis del COI se identificaron para el infraorden Gerromorpha tres especies válidas, *Rheumatobates crassifemur crassifemur* Esaki, 1926 (BIN: ADS5715), *Metrobates amblydonti* Nieser, 1993 (BIN: ADA5000) y *Rhagovelia calopa* Drake & Harris, 1927 (BIN: ACF8744), así como una especie no descrita para *Metrobates* sp. (BIN: ACG0023; [Tabla 2](#)) y once morfotipos agrupados en nueve géneros de cuatro familias ([Tabla 2](#)). Por su parte, para Nepomorpha se identificó una especie perteneciente no descrita de la familia Notonectidae (BIN: AAG5300; [Tabla 2](#)) y tres morfotipos agrupados en tres géneros de esta familia ([Tabla 2](#)).

Para los restantes individuos en ambos infraórdenes los valores alcanzados no fueron significativamente mayores al 98 % de identidad (de acuerdo con el valor E obtenido), con respecto a las especies disponibles en el GenBank. Sin embargo, todos los individuos mostraron alineamientos significativos con secuencias del mismo género, con la excepción a *Ovatametra obesa* Kenaga, 1942 especie para la cual no existen secuencias disponibles y por lo tanto se considera un nuevo registro en la base de datos ([Tabla 2](#)).

Variabilidad y distancia genética

El alineamiento de las secuencias de COI para los 17 individuos de Gerromorpha tuvo una longitud promedio de 567 (± 30) pb, y un % AT promedio de 66,9 ($\pm 1,9$ %), mientras que para los doce individuos de Nepomorpha la longitud fue de 609 pb (excepto para un individuo del morfotipo *Buenoa* sp. 1 para el cual la longitud fue 537 pb), y un % AT de 65,5 ($\pm 1,7$ %) ([Tabla 2](#)). En Gerromorpha se calcularon 197 (33,6 %) sitios variables informativos por parsimonia y un porcentaje de variación nucleotídica única de 11,8 %, mientras que para Nepomorpha 141 sitios variables (23,2 %) y un porcentaje de variación nucleotídica única de 8,2 % fueron calculados.

De acuerdo al menor valor obtenido del BIC, el modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste para Gerromorpha fue el modelo General de Tiempo Reversible más distribución Gamma y fracción de sitios invariables (GTR + G + I). Basado en este modelo las distancias genéticas estimadas entre especies y morfotipos variaron de 0,05 en especies del género *Mesovelia*, hasta 0,29 en *Trepobates*

panamensis Drake & Hottes, 1952 y *Tachygerris* sp. ([Fig. 2a](#)). Para Nepomorpha el modelo más ajustado fue el de Tamura tres-parámetros más una fracción de sitios invariables (T92 + I). Para este infraorden la distancia genética calculada entre especies o morfotipos mostró valores menores a 0,24, particularmente para los morfotipos de la familia Notonectidae y la especie *Buenoa* sp. ([Fig. 2b](#)). Asimismo, entre intra morfotipos los valores de distancia fueron menores a 0,06 ([Fig. 2b](#)).

DISCUSIÓN

En esta investigación se describe por primera vez la entomofauna acuática de la cuenca inundable del Magdalena Medio en la Ciénaga de Palagua, desde una aproximación molecular. La información sobre la diversidad de estos insectos en la ciénaga y la utilidad del uso del código de barras genético para apoyar la identificación de especies permite ampliar el catálogo de especies de estos grupos taxonómicos en Colombia y en el neotrópico. Además, aporta información base para próximos estudios sistemáticos con perspectivas de investigación ecológica y en conservación en diferentes regiones geográficas y sistemas acuáticos. Resaltando el gran potencial de los chinches acuáticos y semiacuáticos para el biomonitoring de la contaminación en ecosistemas acuáticos (Bakonyi *et al.* 2022).

Las distancias genéticas se han explorado en diferentes grupos de insectos, especialmente en Hemiptera, se reconocen los estudios de Barman *et al.* (2017) donde utilizaron diferentes valores de umbral para la delimitación de especies de pentatómidos, además de estudios genéticos en varias especies de hemípteros (Wu *et al.* 2016, Talamas *et al.* 2019, Weirauch *et al.* 2019, Latina *et al.* 2022). Havemann *et al.* (2018) probaron la eficacia de una biblioteca de código de barras de ADN para discriminar especies de Gerromorpha y Nepomorpha de Alemania. Son pocos los esfuerzos para complementar la biblioteca de códigos de barras de ADN en el Neotrópico, y en particular en Colombia no existe aún información disponible para este grupo de insectos acuáticos y semiacuáticos.

Castanhole *et al.* (2013), en Brasil, reportaron valores promedio de variabilidad para Gerromorpha de 0,265, mientras que para Nepomorpha fue menor a 0,203, que posiblemente sea consecuencia de una secuencia del gen COI más conservada pero aún útil para la caracterización de los diferentes taxones, lo que concuerda con lo obser-

Tabla 2. Número de individuos, tamaño y composición de la secuencia nucleótida de COI de Gerrromorpha y Nepomorpha identificados por código de barras y Blastn. * Indica una única secuencia con un tamaño de 537 pb. ‡ Indica un nuevo registro del gen COI para esta especie en el GenBank.

Infraorden	Familia	Especie / morfotipo	n	Tamaño (pb)	% A/T	BIN	Descripción	BLAST (mejor hit)	Código genbank	% Identidad	Valor E	
		<i>Tachygerris</i> sp.	1	569	62,9	-	<i>Tachygerris opacus</i>	MW983670		78	1,E-83	
		<i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i>	2	586	69,4	ADS5715	-	-	-	-	-	
		<i>Rheumatobates imitor</i>	1	481	68,6	-	<i>Rheumatobates rileyi</i>	MG405640		91	3,E-175	
		<i>Metrobates amblydonti</i>	1	585	66,6	ADA5000	-	-	-	-	-	
	Gerridae	<i>Metrobates</i> sp.1	1	569	67,7	ACG0023	-	-	-	-	-	
		<i>Metrobates</i> sp.2	1	585	68,2	-	<i>Metrobates hesperius</i>	LT986735		86	0,E+00	
		<i>Neogerris</i> sp.	2	586	68,2	-	<i>Neogerris</i> sp.	MW982931		89	1,E-133	
		<i>Ovatametra obesa†</i>	1	513	65,9	-	-	-	-	-	-	
		<i>Trepobates panamensis</i>	1	572	67,2	-	<i>Trepobates subnitidus</i>	MG405633		91	0,E+00	
		<i>Trepobates</i> sp.1	1	585	66,6	-	<i>Trepobates subnitidus</i>	MG405633		85	2,E-154	
		<i>Rhagovelia calopa</i>	1	574	66,0	ACF8744	-	-	-	-	-	
	Veliidae	<i>Rhagovelia santanderi</i>	1	559	62,9	-	<i>Rhagovelia obesa</i>	MG999730		84	1,E-145	
		<i>Hydrometridae</i>	<i>Hydrometra</i> sp.1	1	585	68,2	-	<i>Hydrometra stagnorum</i>	MG665426		84	3,E-156
		<i>Mesoveliidae</i>	<i>Mesovelia</i> sp.1	1	585	67,8	-	<i>Mesovelia horvathi</i>	KP978331		86	3,E-161
			<i>Mesovelia</i> sp.2	1	569	67,6	-	<i>Mesovelia fuscata</i>	MG665597		86	2,E-163
			<i>Martarega</i> sp.	4	609	66,6 (± 0,0)	-	<i>Martarega uruguayensis</i>	KY659311		90	0,E+00
	Nepomorpha	<i>Notonecidae</i>	<i>Martarega williamsi</i>	1	609	64,4	-	<i>Martarega brasiliensis</i>	JN689499		82	1,E+140
			<i>Buenoa</i> sp.1	5	609 (*537)	65,2 (± 0,6)	-	<i>Buenoa</i> sp.	KX039484		90	0,E+00
		<i>Notonectidae</i> sp.1	2	609	64,9 (± 0,5)	AAG5300	-	-	-	-	-	

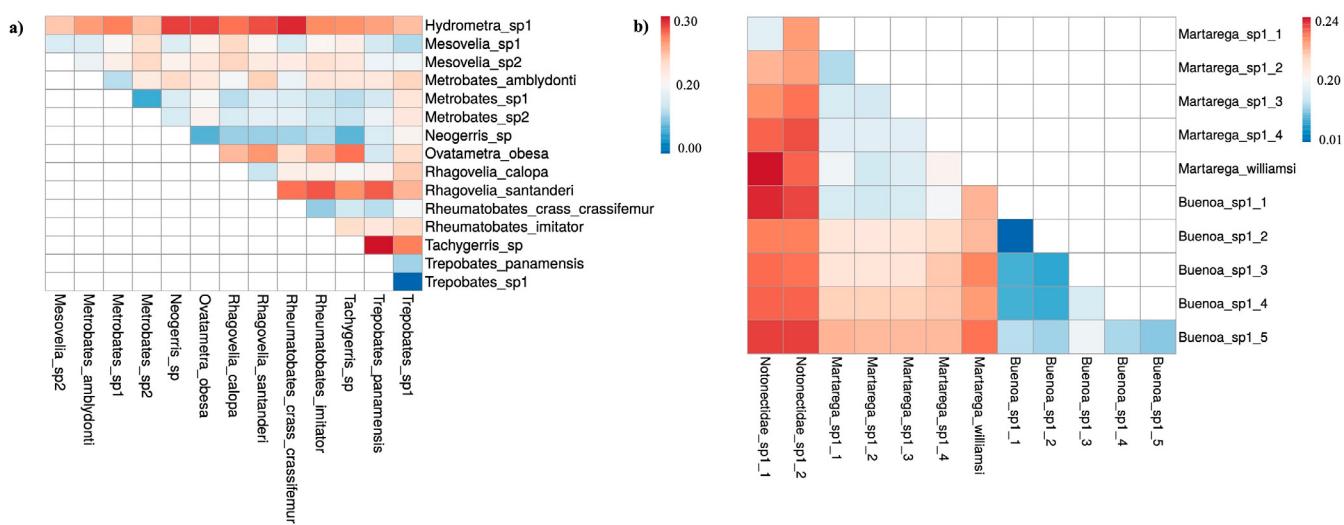


Figura 2. Mapa de calor de las distancias genéticas pareadas de gen COI calculadas para las especies y morfotipos en (a) Gerromorpha y (b) Nepomorpha de la Ciénaga de Palagua en el plano inundable del Magdalena Medio, Colombia.

vado en el presente estudio, donde Gerromorpha presentó valores de mayor distancia genética en comparación con Nepomorpha. A pesar de la congruencia que se presenta en esta investigación, con un mayor muestreo genético se podrán refinar las congruencias, comparación y diferenciaciones entre la diversidad de los infraórdenes Gerromorpha y Nepomorpha. Un tópico importante de investigación que se desprende de este estudio es la necesidad de incluir en los análisis una mayor representación de taxones del infraorden Nepomorpha, con curaduría taxonómica y molecular.

Por otro lado, a nivel de especie, se encontraron distancias intraespecíficas con valores $< 2,2\%$ para *R. crassifemur crassifemur*, *Metrobates* sp. y *Martarega* sp., confirmando así la identidad y la determinación taxonómica para los individuos de estas especies (Fig. 2a). En general, las distancias interespecíficas oscilaron entre tres y 30 %, lo que infiere una alta divergencia en especies de Gerromorpha y Nepomorpha, congruente a lo reportado en diversos estudios a nivel global los cuales sugieren la posibilidad de polimorfismos ancestrales, introgresión, y/o una divergencia de especies crípticas para estos grupos (Damgaard *et al.* 2012, Castanhole *et al.* 2013, Ye *et al.* 2020).

En síntesis, se presenta el primer abordaje molecular de la diversidad de dos de los principales infraórdenes de insectos acuáticos de cuerpos de agua lenticos del Magdalena medio. Estos resultados forman una línea base para el entendimiento a diferentes escalas jerárquicas de la diversidad de Gerromorpha y Nepomorpha en sistemas tropicales

y para el planteamiento de nuevas hipótesis de relaciones taxonómicas y filogenéticas. Se registraron 29 secuencias genéticas para Colombia y un nuevo registro del gen COI para la especie *Ovatametra obesa*, estos resultados contribuyen al establecimiento de la librería de código de barras en la región como un aporte a la conservación de las especies de insectos acuáticos en el Neotrópico. Finalmente, la alta variabilidad entre los hemípteros acuáticos de los infraórdenes Gerromorpha y Nepomorpha, demuestra la resiliencia ecológica de estos insectos y llama la atención sobre la necesidad de aumentar el conocimiento de los chinches acuáticos y semiacuáticos de los sistemas lenticos tropicales con perspectivas de conservación.

PARTICIPACIÓN DE LOS AUTORES

ANP: investigación, análisis y escritura original; AGP: conceptualización, análisis, revisión y edición; IM: conceptualización, recolecta, curaduría, administración, revisión y edición.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto “MUSEÓMICA: una alianza para conectar las colecciones entomológicas de la Universidad Nacional de Colombia, el Instituto Alexander von Humboldt y la UPTC, propiciando la formación de capital humano y la proyección científica y social de las mismas” SGI-UPTC 3597. Agradecemos a Juan Carvajal (UPTC) por la lectura crítica

del manuscrito y a los investigadores Patricia Mondragón (Laboratorio de Entomología UPTC), Felipe Moreira (Instituto Oswaldo Cruz) y Juliana Barbosa (Universidade Federal de Rio de Janeiro) quienes apoyaron y corroboraron la identificación taxonómica de los especímenes.

■ CONFLICTO DE INTERESES

Todos los autores de este trabajo declaramos que no existe conflicto de intereses.

■ LITERATURA CITADA

- Andersen NM. 1995. Cladistic inference and evolutionary scenarios: Locomotory structure, function, and performance in water striders. *Cladistics*. 11(3): 279–295. doi: [https://doi.org/10.1016/0748-3007\(95\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0748-3007(95)90016-0)
- Bakonyi G, Vásárhelyi T, Szabó B. 2022. Pollution impacts on water bugs (Nepomorpha, Gerromorpha): state of the art and their biomonitoring potential. *Environ. Monit. Assess.* 194(301): 1–25. doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09961-2>
- Barbosa JF, Rodrigues HDD. 2015. The True Water Bugs (Nepomorpha). In: Panizzi AR, Grazia J, editors. *True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics*. Dordrecht: Springer Science Business Media: 159–202. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-9861-7_7
- Barman AK, Joyce AL, Torres R, Higbee BS. 2017. Assessing genetic diversity in four stink bug species, *Chinavia hilaris*, *Chlorochroa uhleri*, *Chlorochroa sayi*, and *Thyanta pallidovirens* (Hemiptera: Pentatomidae), using DNA barcodes. *J. Econ. Entomol.* 110(6): 2590–2598. doi: <https://doi.org/10.1093/jee/tox227>
- Brožek J. 2014. Phylogenetic signals from Nepomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) mouthparts: Stylet's bundle, sense organs, and labial segments. *Sci. World J.*, ID 237854. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/237854>
- Buzzetti FM, Zettel H. 2010. Three new species of the water strider genus *Tachygerris* Drake, 1957 (Insecta: Heteroptera: Gerridae) from South America. *Ann. Naturhist. Mus. Wien B* 112: 73–87.
- Carbonell JA, Gutiérrez-Canovas C, Bruno D, Abellán P, Velasco J, Millán A. 2011. Ecological factors determining the distribution and assemblages of the aquatic Hemiptera (Gerromorpha & Nepomorpha) in the Segura River basin (Spain). *Limnetica*. 30(1): 59–70. doi: <https://doi.org/10.23818/limn.30.06>
- Castanhole MMU, Marchensin SRC, Pereira LLV, Moreira FFF, Barbosa JF, Válerio JR, Itoyana MM. 2013. The first assess of the haplotypes from COI gene sequences in species of spittle-bugs (Cicadomorpha: Hemiptera) and aquatic true bugs (Gerromorpha and Nepomorpha: Hemiptera) in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 12(4): 5372–5381. doi: <https://doi.org/10.4238/2013.November.7.12>
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. 1987. A Ribosomal RNA Gene Probe Differentiates Member Species of the *Anopheles gambiae* Complex. *Am.J.Trop.Med.* 37(1): 37–41. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.37>
- Cordeiro I, Moreira FF. 2015. New distributional data on aquatic and semiaquatic bugs (Hemiptera: Heteroptera: Gerromorpha & Nepomorpha) from South America. *BDJ* (3): e4913. doi: <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e4913>
- Correa-Ayram, CA, Etter A, Díaz-Timoté J, Rodríguez Buriticá S, Ramírez W, Corzo G. 2020. Spatiotemporal evaluation of the human footprint in Colombia: Four decades of anthropic impact in highly biodiverse ecosystems. *Ecol. Indic.* 117, 106630. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106630>
- Damgaard J. 2008. Evolution of the semi-aquatic bugs (Hemiptera: Heteroptera: Gerromorpha) with a re-interpretation of the fossil record. *Acta Ent. Mus. Nat. Pra.* 48(2): 251–268.
- Damgaard J. 2012. ¿What do we know about the phylogeny of the semi-aquatic bugs (Hemiptera: Heteroptera: Gerromorpha)? *Entomol. Am.* 118(1): 81–98. doi: <https://doi.org/10.1664/12-RA-030.1>
- Damgaard J, Moreira FF, Hayashi M, Weir TA, Zettel H. 2012. Molecular phylogeny of the pond treaders (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Mesovelidae), discussion of the fossil record and a checklist of species assigned to the family. *Ins. Syst. Evol.* 43(3–4): 175–212. doi: <https://doi.org/10.1163/1876312X04302004>
- Dias-Silva K, Cabette HSR, Juen L, De Marco P. 2010. The influence of habitat integrity and physical-chemical water variables on the structure of aquatic and semiaquatic Heteroptera. *Zoologia*. 27(6): 918–930. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000600013>
- Dixon JD, Oli MK, Wooten MC, Eason TH, McCown JW, Cunningham MW. 2007. Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: the case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*). *Conserv Genet*. 8: 455–464. doi: <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9184-z>
- Estévez AL, Polhemus JT. 2001. The small species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). Key to species groups and a revision of the *denticolle* group. *Iheringia, Sér. Zool.* (91): 151–158. doi: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000200021>
- Floriano CF, Cavichioli RR. 2013. A new species of *Cylindrostethus* Mayr (Hemiptera, Gerromorpha, Gerridae) for the Neotropical Region, with an identification key for the species of Group 1 sensu Drake 1952. *Zootaxa*. 3702(2): 187–192. doi: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3702.2.7>
- 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. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294–299.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to conservation genetics*. University Press, Cambridge. doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>

- García JM, Tapias E. 2011. Diagnóstico ambiental de la ciénaga de Palagua, Puerto Boyacá (Boyacá). [Trabajo de grado]. [Boyacá, Colombia]. Universidad Piloto de Colombia.
- Galindo-Malagón XA, Morales I, Ospina-Garcés SM. 2022. Morphometric tools to solve species complexes: The case of *Rhagovelia angustipes* (Hemiptera: Veliidae). *Arthropod Struct. Dev.* 70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101192>
- Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 13(5): 851–861. doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12138>
- Gligorović B, Savić A, Protić L, Pešić V. 2016. Ecological patterns of water bug (Hemiptera: Heteroptera) assemblages in karst springs: a case study from central Montenegro. *Oceanol. Hydrobiol. St.* 45(4): 554–563. doi: <https://doi.org/10.1515/ohs-2016-0046>
- Grisales N, Triana O, Angulo V, Jaramillo N, Parra-Henao G, Panzera F, Gómez-Palacio A. 2010. Diferenciación genética de tres poblaciones colombianas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) mediante análisis molecular del gen mitocondrial ND4. *Biomédica* 30(2): 207–214. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.184>
- Havemann N, Gossner MM, Hendrich L, Moriniére J, Niedringhaus R, Schäfer P, Raupach MJ. 2018. From water striders to water bugs: the molecular diversity of aquatic Heteroptera (Gerromorpha, Nepomorpha) of Germany based on DNA barcodes. *PeerJ.* 6 (e4577). doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.4577>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acid. S.* 41: 95–98.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(41): 14812–14817. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Johnson KP, Dietrich CH, Friedrich F, Beutel RG, Wipfler B, Peters RS, Allen JM, Petersen M, Donath A, Walden KKO et al. 2018. Phylogenomics and the evolution of hemipteroid insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (50): 12775–12780. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1815820115>
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4): 772–780. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Koroiva R, Gomes VG, Vilela DS. 2022. DNA Barcoding and New Records of Odonates (Insecta: Odonata) from Paraíba State, Brazil. *Diversity* 14(3): 203. doi: <https://doi.org/10.3390/d14030203>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547–1549. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Latina RA, Lantican DV, Guerrero MS, Rubico EC, Laquinta JF, Caoili BL. 2022. Species-specific PCR-based marker for rapid detection of *Aspidiotus rigidus* Reyne (Hemiptera: Diaspididae). *J. Asia Pac. Entomol.* 25(1): 101848. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.101848>
- López-Ruf M. 2004. Situación ambiental de la provincia de Buenos Aires. A. Recursos y Rangos Naturales en la Evaluación Ambiental. Temas de Entomología. Los hemípteros acuáticos y semiacuáticos de la Argentina. 27: 1–23.
- Lopéz-Ruf M, Mazzucconi S, Bachman A. 2003. Heteroptera Acuáticos y semiacuáticos del Parque Nacional Mburucuyá (provincia de Corrientes, Argentina). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 62(1-2): 65–71.
- Mazzucconi SA, López Ruf ML, Bachmann AO. 2009. Hemiptera-Heteroptera: Gerromorpha y Nepomorpha. In: Domínguez E, Fernández H, editores. Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: sistemática y biología. Tucumán, Argentina: Fundación Miguel Lillo; p. 167–232
- Meyin S, Ebong S, Petit E, Le Gall P, Chen PP, Nieser N, Guilbert E, Njiokou F, Marsollier L, Guégan JF, Pluot-Sigwalt D, Eyangoh S, Harry M. 2016. Molecular species delimitation and morphology of aquatic and sub-aquatic bugs (Heteroptera) in Cameroon. *PLoS One*, 11(5): e0154905. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154905>
- Mondragón-Fonseca S, Morales-Castaño I. 2013. Chinches semiacuáticas presentes en el municipio de San Luis de Gaceno, Boyacá, Colombia. *Ciencia en Desarrollo.* 4(2): 13–18.
- Mondragón SP, Molano-Rendón F, Morales-Castaño I. 2017. Cinco nuevas especies de *Tachygerris* (Hemiptera: Gerridae: Gerrinae) y nuevos registros para Colombia. *Caldasia.* 39(2): 204–220. doi: <https://doi.org/10.15446/caldasia.v39n2.60603>
- Morales-Castaño IT, Molano-Rendón F. 2008. Heterópteros acuáticos del Quindío (Colombia): Los infraórdenes Gerromorpha y Nepomorpha. *Rev. Col. Entomol.* 34(1): 121–128. doi: <https://doi.org/10.25100/socolen.v34i1.9263>
- Moreira FF, Alecrim VP, Ribeiro JRI, Nessimian JL. 2011. Identification key to the Gerridae (Insecta: Heteroptera: Gerromorpha) from the Amazon River floodplain, Brazil, with new records for the Brazilian Amazon. *Zoologia.* 28(2): 269. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702011000200018>
- Moreira FF. 2015. The semiaquatic gerromorphans. In: Panizzi AR, Grazia J, editors. True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Dordrecht: Springer Science Business Media; p. 113–156. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-9861-7_6
- Moreira FF, Rodrigues HD, Barbosa JF, Klementová B, Svitok M. 2016. New records of Gerromorpha and Nepomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) from South America. *BDJ* (4) e7975. doi: <https://doi.org/10.3897/BDJ.4.e7975>
- Moreira FF, Cordeiro S, Magalhaes M, Rodrigues HD, Sites W. 2018. Order Hemiptera, chapter 7. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates 3: Keys to Neotropical Hexapoda; p. 175–216 doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804223-6.00007-X>

- Moritz C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *TREE*. 9(10): 373–375. doi: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4)
- Moy KM, Brasil S, Brasil LS, Oliveira-Junior JM, Juen L, Vieira JB, Dias-Silva K. 2022. Effects of Environmental Changes on Gerromorpha (Heteroptera: Hemiptera) Communities from Amazonian Streams. *Hydrobiologia* 1(1): 111–121. doi: <https://doi.org/10.3390/hydrobiology1010008>
- Murillo-Montoya SA, Restrepo-Bastidas ES, Mendoza-Mora A, Fadul-Vázquez J, Calderón-García XF, Rodríguez MA. 2018. Macroinvertebrados asociados a raíces de *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) en la Ciénaga de Palagua (Colombia). *Ambiente y Desarrollo*, 22(43). doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.ayd22-43.mare>
- Nieser N, González R, Eichelkraut E. 1993. Nuevas especies de Naucoridae Fallen, (Heteroptera: Nepomorpha). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 1(1): 1–11.
- Nieser N, López-Ruf M. 2001. A review of *Limnocoris* Stål (Heteroptera: Naucoridae) in southern South America east of the Andes. *Tijdschr. Entomol.* 144: 261–328. doi: <https://doi.org/10.1163/22119434-900000091>
- Olosutean H, Bungiac S, Perju M. 2019. Are aquatic and semi-aquatic true bugs (Hemiptera: Nepomorpha; Gerromorpha) distinct aquatic communities? A case study in homogeneous habitats, *Inland Waters* 9(4): 513–521. doi: <https://doi.org/10.1080/20442041.2019.1600937>
- Otalora G, Santos T. 2011. Diagnóstico ambiental de la Ciénaga de Palagua, Puerto Boyacá (Boyacá) [Trabajo de grado]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Piloto de Colombia.
- Park DS, Foottit R, Maw E, Hebert PD. 2011. Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *PLoS ONE* 6(4): e18749. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018749>
- Polhemus D. 1997. Systematic of the genus *Rhagovelia* Mayr (Heteroptera: Veliidae) in the western Hemisphere (Exclusive of the *angustipes* Complex). *Monographs Thomas Say Publications in Entomology. ESA*. 369–374. doi: <https://doi.org/10.4182/JCRD5977>
- Polhemus JT, Polhemus DA. 2008. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: 379–391. doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9033-1>
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*. 87 (e66213). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Roback S, Nieser N. 1974. Aquatic Hemiptera (Heteroptera) from the Llanos of Colombia. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.*. 126(4): 29–49.
- 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. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(6): 651–701. doi: <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *TREE* 22(1): 25–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>
- Talamas EJ, Bon MC, Hoelmer KA, Buffington ML. 2019. Molecular phylogeny of *Trissolcus* wasps (Hymenoptera, Scelionidae) associated with *Halyomorpha halys* (Hemiptera, Pentatomidae). *J. Hymenopt. Res.* 73: 201. doi: <https://doi.org/10.3897/jhr.73.39563>
- Turić N, Merdić E, Hackenberger BK, Jeličić Z, Vignjević G, Csabai Z. 2012. Structure of aquatic assemblages of Coleoptera and Heteroptera in relation to habitat type and flood dynamic structure. *Aquat. Insects.* 34(1): 189–205. doi: <https://doi.org/10.1080/01650424.2012.643059>
- Wang YH, Cui Y, Rédei D, Baňař, P, Xie Q, Štys P, Damgaard J, Chen PP, Yi W-B, Wang Y, Dang K, Li C-R, Bu WJ. 2016. Phylogenetic divergences of the true bugs (Insecta: Hemiptera), with emphasis on the aquatic lineages: the last piece of the aquatic insect jigsaw originated in the Late Permian/Early Triassic. *Cladistics*. 32(4): 390–405. doi: <https://doi.org/10.1111/cla.12137>
- Weirauch C, Schuh RT, Cassis G, Wheeler WC. 2019. Revisiting habitat and lifestyle transitions in Heteroptera (Insecta: Hemiptera): insights from a combined morphological and molecular phylogeny. *Cladistics*. 35(1): 67–105. doi: <https://doi.org/10.1111/cla.12233>
- Wu YZ, Yu SS, Wang YH, Wu H-Y, Li X-R, Men X-Y, Zhang Y-W, Rédei D, Xie Q, Bu W-J. 2016. The evolutionary position of Lestoniidae revealed by molecular autapomorphies in the secondary structure of rRNA besides phylogenetic reconstruction (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zool. J. Linn. Soc-Lond.* 177(4): 750–763. doi: <https://doi.org/10.1111/zoj.12385>
- Ye Z, Damgaard J, Yang H, Hebsgaard MB, Weir T, Bu W. 2020. Phylogeny and diversification of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha). *Cladistics*. 36(1): 72–87. doi: <https://doi.org/10.1111/cla.12383>.