

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA

**SUPER ÁRVORES FILOGENÉTICAS PARA GALERUCINAE (COLEOPTERA:  
CHRYSOMELIDAE) E SILURIFORMES (TELEOSTEI: OSTARIOPHYSI)  
AGRUPANDO DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**Ponta Grossa**  
**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA

**SUPER ÁRVORES FILOGENÉTICAS PARA GALERUCINAE (COLEOPTERA:  
CHRYSOMELIDAE) E SILURIFORMES (TELEOSTEI: OSTARIOPHYSI)  
AGRUPANDO DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Mara Cristina de Almeida

Co-orientador: Guilherme Schnell e Schühli

**Ponta Grossa**

**2013**

Catálogo na Fonte  
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A447 Almeida, Rafael Bonfim de  
Super árvores filogenéticas para Galerucinae (coleoptera: chrysomelidae) e siluriformes (teleostei: ostariophysi) agrupando dados morfológicos e moleculares / Rafael Bonfim de Almeida. Ponta Grossa, 2013.  
105f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientadora: Dra Mara Cristina de Almeida.

Co-orientador: Dr. Guilherme Schnell e Schühli.

1. 28S rDNA. 2. COI. 3. Evolução. 4. Filogenia. 5. Meta análise. I. Almeida, Mara Cristina de. II. Schühli, Guilherme Schnell e. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575



## Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 11/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA**.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora UEPG), Dr. Guilherme Schnell e Schühli (Co-orientador EMBRAPA) Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) e Elynton Nascimento (UNICENTRO), Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Super Árvores Filogenéticas para Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) e Siluriformes (Pisces: Ostariophysi) Agrupando dados Morfológicos e Moleculares**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Guilherme Schnell e Schühli

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof. Dr. Elynton Nascimento

Orientadora  
Dra. Mara Cristina de Almeida

Co-orientador  
Dr. Guilherme Schnell e Schühli

*Às mulheres da minha vida: Fernanda, Kátia e Laís.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer muito a minha mãe, Kátia Maria Bonfim de Almeida. Ela é pessoa responsável por toda minha formação e pelo meu caráter, ela sempre esteve ao meu lado e sempre me apoiou (financeira e emocionalmente), ela sempre acreditou e nunca desistiu de mim, ela é a pessoa que guia meus passos e é o meu exemplo. Obrigado mãe, serei eternamente grato a você.

Precisamos de alguém que nos guie e nos oriente nessa caminhada científica com sabedoria e paciência, por isso agradeço imensamente à minha orientadora, professora Dra. Mara Cristina de Almeida, que é responsável por grande parte da minha formação acadêmica, dividindo o seu conhecimento desde as aulas de Genética Geral, e Genética Molecular na graduação, nas disciplinas de mestrado, nas orientações de Trabalho de Conclusão de Curso e dissertação de mestrado, e também naquelas conversas informais de cafezinho. Muito obrigado pela paciência e presteza.

Especiais agradecimentos ao meu co-orientador, e amigo Dr. Guilherme Schnell e Schühli, que mesmo com os quilômetros de distância entre Ponta Grossa e Curitiba/Colombo, e as dificuldades e barreiras impostas por correspondências eletrônicas nunca abandonou o barco, e sempre esteve presente e disposto a ajudar, contribuindo muito para o trabalho com seu imenso conhecimento. Muito obrigado Gui!

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Dr. Roberto Ferreira Artoni pela acolhida no laboratório de Citogenética e Evolução, pela confiança e pelo incentivo às ideias contidas neste trabalho, desde a época de graduação, o que foi muito importante para que esta tese se consolidasse, e também pelas valiosíssimas contribuições e sugestões essenciais ao desenvolvimento deste. Gostaria também de agradecer aos professores Dr. Marcelo Ricardo Vicari e Dra. Viviane Nogaroto, que durante o dia a dia de laboratório estão sempre presentes e sempre atuantes no processo de formação e aprendizado daqueles que estão na bancada. Além disso, a união dos professores Roberto, Mara, Marcelo e Viviane, nos proporcionam uma ótima estrutura e também um ótimo ambiente de trabalho, que foram fundamentais para a construção deste trabalho e tenho certeza que serão fundamentais para as próximas gerações. Da mesma forma agradeço aos professores Dr. Giovanni Marino Fávero, Dra. Sônia A. Pileggi e ao Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva UEPG-UNICENTRO e a todos os professores, alunos e pessoal envolvido. Em especial à secretária Zoli Oliveira e ao coordenador Marcos Pileggi, pela estrutura e suporte que o Programa oferece aos seus alunos.

Deixo aqui também meu agradecimento a todos os mestres que participaram da minha formação acadêmica, desde os professores das séries iniciais até os da graduação e mestrado. À Universidade Estadual de Ponta Grossa, todos os seus funcionários, pela formação e estrutura cedida.

Agradeço ao professor Dr. Elynton Nascimento e a professora Dra. Rosângela Capuano Tardivo pelas importantes sugestões e críticas ao trabalho.

Ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e a Carlos Campaner pela identificação das espécies de Coleoptera utilizadas neste estudo. A ACTGene Análises Moleculares pela realização dos sequenciamentos.

Gostaria de agradecer imensamente a toda minha família, pelo apoio e compreensão durante esta caminhada. Vou citar os que fizeram parte mais intensamente desta época, mas todos os integrantes das famílias Almeida, Bonfim, Iegelski, Gravina e Tozetto sintam-se abraçados. À minha irmã, Laís Bonfim de Almeida, pela paciência e cumplicidade. Aos meus queridos avós: Helena Iegelski Bonfim, Valmírio Bonfim (*in memoriam*), Teresinha Souza de Almeida e Denisar Martins de Almeida. A Hamilton, Marli, Marcus Vinícius, Alexandre, Sérgio, Sílvia, Natália, Miguel. Walmensi (grande goleiro), Débora, Roger, Vanderli (zagueiro canhoto de ouro), Adriane, Ramon, Dica, Larissa, Rafael e Carlos. A Marinéia, Ricardo e Diego Gravina.

Aos companheiros: Shaman, Thor e Bóris. É ótimo chegar em casa, as vezes preocupado e cansado, e ser recepcionado com pulos, lambidas, mordidas e companhia tão verdadeira e carinhosa.

Sem amigos e um ambiente agradável de trabalho seria muito mais difícil chegar até aqui, portanto gostaria de agradecer a grandes amigos nesta seção. Agradeço primeiramente ao amigo Miguel Airton, pelo suporte técnico na rotina de trabalho e pelo ânimo e astral de todos os dias. Aos amigos de laboratório: Karina, Kaline, Kamila, Michele V., Michelle O., Bárbara, Diana, Marcela, Patrícia, Jonathan, Luís, Felipe, Tajiana, Jordana, Alex, Thaís e Lucas. Aos amigos Douglas Rundvalt, Luís Reinaldo Ruth, André Luís Cellarius, Janaíne Mioduski, Rodrigo Weiss, Letícia Weiss, Geison Schmidt e Nickolas Grzebielucka.

Agradeço de forma especial aos meus amigos, companheiros, membros, e co-fundadores do *Winterfellas*<sup>®</sup>: Alain Victor de Barros, Leonardo Gusso Goll, e Paulo Vinícius Svidnicki. Mais do que uma sociedade, fundamos e mantemos uma grande amizade. Os churrascos, cervejadas, festas, petiscadas, degustações de vinhos e queijos, madrugadas de ps3 e War, jogos (no estádio ou pela tv), coletas, discussões e conversas do *Winterfellas*<sup>®</sup> foram essenciais para a manutenção da sanidade durante esse período, fomentar ideias,

renovar o ânimo e para o progresso desse trabalho.

Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação Araucária.

Por último, porém não menos importante, agradeço à Fernanda Gravina, minha namorada, minha companheira, meu suporte e minha melhor amiga. *FeR*, obrigado *sinceramente* por estar ao meu lado, firme *como uma rocha*. Sem o seu incentivo e apoio (desde a graduação!) eu nunca teria chegado tão longe e, *de fé*, tenho certeza de que juntos chegaremos muito mais longe. Vou ser grato a você, *para sempre*!

*“When you walk through a storm  
Hold your head up high  
And don't be afraid of the dark  
At the end of the storm  
There's a golden sky  
And the sweet silver song of a lark  
Walk on... Through the wind  
Walk on... Through the rain  
Though your dreams be tossed and blown  
Walk on... Walk on...  
With hope in your heart  
And you'll never walk alone”*

– Richard Rodgers e Oscar Hammerstein II by Gerry & The Pacemakers / Liverpool Football Club anthem –

*“There is Always Hope.”*  
– Aragorn Telcontar, son of Arathorn –  
O Senhor dos Anéis (J.R.R. Tolkien)

*“É fácil alcançar a imortalidade, basta fazer uma coisa notável.”*  
– Darrell “Dimebag” Abbott –

*“Não existe verdadeira inteligência sem bondade.”*  
– Ludwig Van Beethoven –

*“The time will come, I believe, though I shall not live to see it, when we shall have very fairly  
true genealogical trees of each great kingdom of Nature.”*  
– C. Darwin in letter to T. H. Huxley 26th September 1857 –

## RESUMO

A grande quantidade de dados filogenéticos que vêm sendo disponibilizados, principalmente de caráter molecular, com os avanços de técnicas de obtenção, amplificação e sequenciamento de moléculas de DNA, RNA e proteínas, oferece uma nova perspectiva para a resolução de relações filogenéticas de grupos problemáticos. Porém, esta crescente quantidade de dados necessita de estratégia de integração e análise conjunta tanto entre os dados moleculares *a per se* quanto com outros dados anteriores, como dados morfológicos, citogenéticos, etológicos, entre outros. Uma alternativa recente para essa integração e metanálise filogenética é a abordagem de construção de super árvores, que consiste no princípio de agrupamento de filogenias independentes menores que possuem táxons terminais em comum em uma filogenia maior, construída com maior número de caracteres, com maior número de táxons terminais, sendo, portanto uma importante ferramenta para inferências mais acuradas quanto à sistemática, evolução, biologia, etologia, biogeografia e citogenética já que oferece uma perspectiva mais ampla do grupo em estudo. Neste estudo, dois grupos problemáticos quanto à sistemática filogenética foram escolhidos e analisados sob a perspectiva da abordagem de construção de super árvore. Para a subfamília Galerucinae *sensu lato* foi realizada uma filogenia molecular para espécies de Alticinae com ênfase na tribo Oedionychini a partir do alinhamento das sequências do segmento de expansão 2 (D2) do gene nuclear para 28S rDNA (28S-D2) e o gene mitocondrial para a subunidade I do Citocromo Oxidase C (COI), sendo essa filogenia juncionada com sequências associadas a bancos de dados e utilizadas em estudos filogenéticos anteriores. Posteriormente essa filogenia molecular foi integrada a uma super árvore construída para Galerucinae *sensu lato*. A super árvore recuperou a monofilia de Galerucinae com um grupo Alticinae parafilético. Para a ordem Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii) foi construída uma super árvore baseada tanto em dados morfológicos quanto dados moleculares, contendo todas as famílias do grupo na topologia final. A topologia final recuperou a monofilia de Siluriformes, com Diplomystidae sendo o silurídeo mais basal e grupo-irmão do restante dos Eusiluroidei.

**Palavras-chave:** 28S rDNA. COI. Evolução. Filogenia. Meta análise. Sistemática.

## ABSTRACT

The large amount of phylogenetic data that are being available, with predominance of molecular, with the recent advances in techniques to obtainment, amplification and sequencing of DNA molecules, RNA and proteins, offer a new perspective for solving phylogenetic relationships of problem groups. However, this increased amount of data requires integration strategies and combined analysis of data, gathering the molecular *per se* with other previous data, such as morphological, cytological, ethological, and others. A recent alternative for this integration and phylogenetic meta-analysis is the Supertree Construction approach, that in principle consists in a gathering of independent smaller phylogenies that have some terminal taxa in common into a larger phylogeny, built with more characters, major number of terminal taxa, being an important tool for more accurate inferences about the systematics, evolution, biology, ethology, biogeography, cytogenetics, and others, once it offers a broader perspective of the study group. In this study, two problematic groups about their phylogenetic systematics were selected and analyzed under the perspective of the Supertree Construction approach. For subfamily Galerucinae *sensu lato* was performed a molecular phylogeny for Alticinae species with emphasis on the segment Oedionychini, based on alignment of the sequences of expansion segment 2 (D2) of nuclear 28S rDNA gene (28S-D2), and the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase c (COI), being this phylogenies gather with other data used in previous phylogenetic studies. Later, this molecular phylogeny was incorporated into a supertree, constructed for Galerucinae *sensu lato*. The supertree recovered the monophyly of a Galerucinae group, and paraphyletic Alticinae. To order Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) was built a supertree based on both, morphological and molecular data, containing all families recognized for the group. The final topology recovered the monophyly of Siluriformes with Diplomystidae being the most basal catfish and sister group of the rest of Eusiluroidei.

**Keywords:** 28S. COI. Evolution. Metanalysis. Phylogeny. Systematics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 1.1. Da classificação taxonômica de *Galerucinae sensu lato* (Coleoptera: Chrysomelidae)

**Figura 1** – Principais classes distinguíveis do fêmur posterior inflado em Alticinae, alterado de Ge et al. (2011). Sendo (a) *Mimastra limbata*, (b) *Hespera sp.*, (c) *Laboissiera sculpurata* e (d) *Clitea fulva* (barra representa 0,5 mm)..... 21

### 3.1. Material Biológico

**Figura 2** – Espécies de coleópteros utilizados no estudo filogenético. (a) *Omophoita sexnotata* (b) *Omophoita communis*; (c) *Alagoasa florigera* (d) *Megistops vandepolli*; (e) *Pleurasphaera decipiens*; (f) *Systema tenuis*; (g) *Heikertingerella argentinensis*; (h) *Wanderbiltiana festiva*; (i); *Eumolpus sp*; (j) *Stolas chalybae*; (k) *Phaedon confinis*..... 30

**Figura 3** - (a) Mapa do sul do Brasil, com a localização das cidades onde foram realizadas as coletas, (b) pontos específicos de coleta no estado do Paraná, (c) pontos específicos de coleta no estado do Rio Grande do Sul..... 32

### 4.1. Filogenia Molecular para *Galerucinae sensu lato* com ênfase na tribo *Oedionychini* (Chrysomelidae: Alticinae) baseado nos genes Citocromo Oxidase I e 28S-D2 rDNA

**Figura 1** - Filogenia molecular para *Galerucinae sensu lato* com base no alinhamento do 28S-D2 rDNA. Espécies em azul são referentes à *Galerucinae sensu stricto*, espécies em vermelhos referentes à Alticinae, e espécies em preto referentes aos grupos-externos. Números ao lado dos ramos representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações..... 45

**Figura 2 -** Análise combinada do grupo de dados moleculares, incluindo o 28S-D2 rDNA e o gene COI. Espécies em vermelho são referentes à Alticinae, espécies em azul à Galerucinae, espécies em preto aos grupos-externos. Números no topo dos nós representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações..... 46

#### 4.2. Análise filogenética consensual para Galerucinae sensu lato (Coleoptera: Chrysomelidae) contemplando dados morfológicos e moleculares

**Figura 1 -** Visão geral da super árvore para Galerucinae sensu lato, com ênfase nas relações mais basais entre Galerucinae sensu stricto e Alticinae. Ramos em azul correspondem Galerucinae sensu stricto e ramos em vermelho à Alticinae..... 55

**Figura 2 -** Super árvore filogenética construída para a subfamília Galerucinae sensu lato com base em dados morfológicos e moleculares utilizando Máxima Parcimônia, com 1000 replicações, utilizando *ratchet*. Gêneros em azul são referentes à Galerucinae sensu stricto, gêneros em vermelho referentes à Alticinae..... 56

#### 4.3. Super Árvore Filogenética de Nível Superior para a ordem Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii) reunindo dados morfológicos e moleculares

**Figura 1-** Super árvore filogenética para Siluriformes, utilizando Máxima Parcimônia. Números na base dos nós representam o valor de *bootstrap*. Esquema de cores dos ramos representam as superfamílias recuperadas, em verde Sisoroidea; em azul Loricarioidea; em amarelo Siluroidea; em cinza Doradoidea e em vermelho Bagroidea..... 66

## LISTA DE TABELAS

### 3.1. Material Biológico

**Tabela 1** - Lista das espécies da subfamília *Galerucinae sensu lato* analisadas, e as espécies utilizadas como grupos-externos..... 29

**Tabela 2** - Locais de coleta, com a descrição da cidade e das coordenadas de GPS..... 31

### 3.2.2. PCR e Sequenciamento

**Tabela 3** - *Primers* utilizados na amplificação das regiões desejadas..... 34

### 3.2.3. Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

**Tabela 4** - Lista de espécies cujas sequências foram utilizadas neste trabalho com seus respectivos Números de Acesso no GenBank..... 36

### 4.1. Filogenia Molecular para *Galerucinae sensu lato* com ênfase na tribo Oedionychini (Chrysomelidae: *Galerucinae*) baseado nos genes Citocromo Oxidase I e 28S-D2 rDNA

**Tabela 1** - Lista das espécies da subfamília *Galerucinae sensu lato* analisadas, e as espécies utilizadas como grupos-externos..... 42

**Tabela 2** - Sequência dos *primers* utilizados na amplificação das regiões específicas para 28S-D2 rDNA e COI..... 43

**Tabela 3** - Número médio de comprimento (pb), a média de bases para cada sequência (porcentagem) e o número de caracteres informativos para parcimônia..... 47

#### **4.2. Análise filogenética consensual para Galerucinae sensu lato (Coleoptera: Chrysomelidae) contemplando dados morfológicos e moleculares**

**Tabela 1** - Contendo as árvores-fonte utilizadas como *input* na construção da super árvore para a subfamília Galerucinae sensu lato, o tipo dos caracteres utilizados nas análises e as referências..... 53

#### **4.3. Super Árvore Filogenética de Nível Superior para a ordem Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) reunindo dados morfológicos e moleculares**

**Tabela 1** - Contendo a identificação das árvores *inputs*, com o número de unidades taxonômicas (OTU's), o tipo de dado utilizado e o trabalho original das árvores-fonte utilizadas na construção da super árvore..... 65

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                        | <b>18</b> |
| 1.1. <i>Da classificação taxonômica de Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae).....</i>                                                                                          | 20        |
| 1.2. <i>Da ordem Siluriformes.....</i>                                                                                                                                           | 24        |
| 1.3. <i>Do Método de Construção de Super Árvore (Supertree Construction).....</i>                                                                                                | 25        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                         | <b>28</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                | <b>29</b> |
| 3.1. Material Biológico.....                                                                                                                                                     | 29        |
| 3.2. Metodologias.....                                                                                                                                                           | 33        |
| 3.2.1. <i>Extração de DNA.....</i>                                                                                                                                               | 33        |
| 3.2.2. <i>PCR e Sequenciamento.....</i>                                                                                                                                          | 34        |
| 3.2.3. <i>Alinhamento das sequências e análises filogenéticas.....</i>                                                                                                           | 35        |
| 3.2.4. <i>Análises Filogenéticas consensuais – "Supertree Construction".....</i>                                                                                                 | 35        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                                       | <b>38</b> |
| 4.1. Filogenia Molecular para Galerucinae <i>sensu lato</i> com ênfase na tribo Oedionychini (Chrysomelidae: Alticinae) baseado nos genes Citocromo Oxidase I e 28S-D2 rDNA..... | 39        |
| 4.2. Análise filogenética consensual para Galerucinae <i>sensu lato</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) contemplando dados morfológicos e moleculares.....                           | 50        |
| 4.3. Super Árvore Filogenética de nível superior para Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) reunindo dados morfológicos e moleculares.....                                      | 61        |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                                              | <b>69</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                        | <b>71</b> |
| <b>7. APÊNDICES.....</b>                                                                                                                                                         | <b>86</b> |
| <b>APÊNDICE A</b> - Alinhamento das sequências referentes ao gene 28S-D2 rDNA.....                                                                                               | 86        |
| <b>APÊNDICE B</b> - Alinhamento das sequências do gene Citocromo Oxidase c Subunidade I (COI).....                                                                               | 96        |
| <b>APÊNDICE C</b> - Lista dos 190 gêneros utilizados no processo de construção de super árvore para Galerucinae <i>sensu lato</i> .....                                          | 103       |

## 1. INTRODUÇÃO

A Sistemática Biológica atual, como um todo, pode ser encarada como a conversão de três fatores importantes de transformação, sendo o primeiro deles a filosofia da escola cladística, uma escola sistemática iniciada por Willi Hennig; o segundo fator é o advento de técnicas moleculares, aumentando de maneira significativa as características passíveis de análise, e o terceiro, o desenvolvimento da tecnologia da informação podendo agrupar a grande quantidade de novas informações filogenéticas geradas pelas técnicas moleculares, com as informações morfológicas, ecológicas, comportamentais, e demais já existentes, e analisando tais informações através de algoritmos computacionais que seguem as premissas da escola cladista (CRACRAFT et al., 2004).

Devido a sua ampla utilidade, é notória a importância de se inferir filogenias com métodos que se mostrem consistentes, robustos e eficientes (HILLIS, 1995). Para se alcançar isso é necessário um número apropriado de caracteres, e que estes sejam capazes de refletir a história com um número mínimo de distúrbios e ambiguidades (SWOFFORD et al., 1996). No entanto, esse fato é dificultado devido a filogenias imprecisas resultantes de análises isoladas baseadas em grupos de dados simples ou construídas sem o devido cuidado com os critérios filogenéticos durante a análise. Por outro lado, hipóteses filogenéticas baseadas em grupos de dados múltiplos são bem-suportadas, mas mostram-se, na maioria das vezes, contraditórias (GRIFFITHS et al., 2004).

Uma ampla e bem suportada filogenia, além de seu valor sistemático representa uma ferramenta para se testar hipóteses em grande escala na natureza, incrementando o poder estatístico de banco de dados associados. Atualmente, na maioria das vezes não é possível a construção de grandes e amplas árvores completamente compreensíveis devido à desigualdade dos esforços de pesquisas através de toda a extensão dos táxons, resultando em dados insuficientes (BININDA-EMONDS, 2005; SANDERSON; DRISKELL, 2003).

O advento de técnicas moleculares proporcionou um salto na quantidade de dados obtidos, proporcionando aquisição de grande número de caracteres. Durante a década de 1960 métodos para o exame de estruturas moleculares de proteínas e ácidos nucleicos começaram a ser adotados entre os biólogos evolucionistas, o que aumentou a quantidade de dados disponíveis para estimativas filogenéticas de alguns táxons (HILLIS; MORITZ, 1987). Outro grande avanço no campo da aplicação da sistemática molecular foi o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para investigar variações em grande escala no DNA (HILLIS; MORITZ, 1987; KLEPPE et al., 1971; MULLIS; FALOONA, 1987).

O terceiro fator, e mais recente, é o desenvolvimento tecnológico da informação, com a criação de *softwares* e *hardwares* que atuam como um meio de agrupar a corrente filosófica da Escola Cladista, e a crescente quantidade de informação gerada pelos dados moleculares, juntamente com os dados já existentes como os morfológicos e comportamentais.

Embora os critérios para reconhecimento e polarização das características morfológicas a serem analisadas tenham evoluído desde o começo, ainda existem caracteres que são duvidosos devido aos processos de reversão, evolução paralela, e quanto à polarização dos mesmos, devido a estruturas de difícil reconhecimento, por exemplo.

Com o aprimoramento de técnicas moleculares, além do aumento no número de caracteres passíveis de análise através da comparação de biomoléculas, ocorreu que a abordagem molecular para a sistematização passou a ser uma alternativa viável para aqueles grupos em que as abordagens morfológicas e etológicas eram duvidosas ou de difícil acesso.

Frequentemente na literatura encontram-se debates referentes ao assunto “*Dados Morfológicos versus Dados Moleculares*”, onde se defende fortemente uma abordagem e se desacredita a outra, porém durante séculos na literatura as abordagens morfológicas predominaram nas classificações sistemáticas, enquanto as abordagens moleculares ganharam força nas últimas décadas. É inegável a maximização dos caracteres passíveis de análise com o advento da abordagem molecular e a importância de tal técnica no campo da sistemática.

As discussões com relação a quais dados, se morfológicos ou moleculares, produzem as classificações mais corretas são limitadas pelo fato de que um tipo de dado está diretamente ligado a outro, pois a morfologia é a codificação da informação contida nas biomoléculas (e.g., DNA, RNA, proteínas), e a diferença nas abordagens é que para cada caso uma técnica pode se mostrar mais acessível ou sensível que outra. Assim sendo, uma análise holística integrada dos diferentes tipos de dados inferidos para os táxons se mostra uma condição efetiva para reunir as informações filogenéticas existentes e assim se chegar a filogenias mais verdadeiras e assertivas entre os táxons.

Na literatura, é frequente a discussão a respeito de grupos taxonômicos que são de difícil investigação filogenética devido a sua grande biodiversidade, grande número de categorias taxonômicas, de espécies crípticas, e de abrangente distribuição geográfica. Como exemplo, pode-se citar a relação entre as famílias da ordem Siluriformes que é classificada por De Pinna (1998) como o maior problema da sistemática de Peixes, e as relações entre os galerucíneos verdadeiros (*Galerucinae sensu stricto*) e os alticíneos (*Alticinae*) da ordem Coleoptera, a qual é a maior e uma das mais abrangentes ordens do Reino Animal. Além disso, o agrupamento entre *Galerucinae* e *Alticinae* vem sendo utilizado como modelo para

diversos mecanismos de evolução, e também representam pragas agrícolas (GILLESPIE et al., 2008; METCALF, 1994) que acarretam grandes prejuízos em plantações principalmente nas de feijão e milho (SPIKE; TOLLEFSON, 1991). Konstantinov (1998) aponta que galerucíneos e alticíneos constituem o grupo de maior importância econômica entre os insetos em que ainda não se há um consenso filogenético.

### **1.1. Da classificação taxonômica de *Galerucinae sensu lato* (Coleoptera: Chrysomelidae)**

A ordem Coleoptera é uma das ordens mais diversas do planeta com aproximadamente 350.000 espécies descritas, representando um quarto do total de espécies de seres vivos e quase 40% das espécies de insetos, sendo que o número real de espécies é provavelmente de uma diversidade maior (GÓMEZ-ZURITA et al., 2007; GROVE E STORK, 2000; HAMMOND, 1992).

A família Chrysomelidae possui mais de 37.000 espécies descritas, sendo umas das maiores famílias da ordem Coleoptera, com a perspectiva de que esse número atinja mais de 60.000 espécies com a descrição de novas espécies a serem futuramente descobertas (REID, 1995). Chrysomelidae possui grande importância econômica (GÓMEZ-ZURITA et al., 2007; JOLIVET E VERMA, 2002) e também é um grupo modelo para a investigação de coevolução da herbivoria em plantas (BECERRA, 1997; EHRLICH; RAVEN, 1964; MITTER; FARRELL, 1991). As relações basais de Chrysomelidae são pouco compreendidas, assim como as relações no nível das espécies dentro de alguns ramos. A família foi subdividida em 16 subfamílias por Seeno e Wilcox (1982), e em outra abordagem mais conservadora Reid (1995, 2000) considerou apenas 11 subfamílias, sendo elas Donaciinae, Sagriinae, Bruchinae, Criocerinae, Hispinae, Lamprosomatinae, Cryptocephalinae, Galerucinae, Chrysomelinae, Eumolpinae e Spilophorynae.

Inferências quanto às relações basais de Chrysomelidae foram investigadas através de caracteres morfológicos e moleculares, com alinhamento de sequências dos genes de RNAs ribossomais nucleares dos genes 18S (SSU) e 28S (LSU) e do mitocondrial 16S (rrnL). Além disso, estes genes têm sido utilizados para investigar a relação dos Chrysomelidae com as plantas Angiospermas hospedeiras (GÓMEZ-ZURITA et al., 2007).

Galerucíneos e alticíneos são reconhecidamente grupos relacionados, porém diversas análises realizadas com caracteres independentes têm revelado hipóteses conflitantes quanto às histórias evolutivas de relacionamento destes grupos (CROWSON; CROWSON, 1996;

FARRELL, 1998; KIM; KJER; DUCKETT, 2003; REID, 1995).

Galerucinae *sensu stricto* possui mais de 5.800 espécies de besouros alocadas em 488 gêneros (KIM; KJER; DUCKETT, 2003; SEENO E WILCOX, 1982). Os Alticinae, conhecidos como besouros-saltadores, ou besouros-pulga (tradução do termo em inglês *Flea Beetles*), por sua vez, são considerados grupo-irmão dos Galerucinae, mas são alocados frequentemente em uma tribo distinta, a tribo Alticini, porque possuem uma estrutura modificada para o salto na perna traseira (sendo as principais classes distinguíveis de tal estrutura apresentadas na Figura 1), que dentre outras apomorfias, os distinguem dos galerucíneos verdadeiros. Os Alticinae possuem aproximadamente 8.000 espécies em mais de 560 gêneros (KIM; KJER; DUCKETT, 2003; SEENO; WILCOX, 1982). Assim o Complexo Galerucinae *sensu lato*, ou seja, os Galerucinae verdadeiros (Tribo Galerucini) mais os besouros-saltadores (Tribo Alticini) possuem mais de 13.000 espécies e é o maior grupo dentro de Chrysomelidae (GILLESPIE et al., 2008; RILEY et al., 2002).

A subfamília Galerucinae *sensu lato* é fortemente relacionada com a subfamília Chrysomelinae (DUCKETT; GILLESPIE; KJER, 2004; GÓMEZ-ZURITA et al., 2007; FARRELL, 1998; REID, 1995, 2000), o que torna os integrantes da subfamília Chrysomelinae potenciais grupos-externos para investigações das relações entre gêneros dentro da subfamília Galerucinae.



**Figura 1** – Principais classes distinguíveis do fêmur posterior inflado em Alticinae, alterado de Ge et al. (2011). Sendo (a) *Mimastra limbata*, (b) *Hespera* sp., (c) *Laboissiera sculpurata* e (d) *Clitea fulva* (barra representa 0,5 mm).

Tanto galerucíneos quanto alticíneos possuem espécies que vem sendo utilizadas para controle biológico de ervas daninhas (WHITE, 1996), assim como importantes espécies praga como, por exemplo, Luperini, que é responsável por prejuízos bilionários nas plantações de milho e feijão (GILLESPIE et al., 2008; METCALF, 1994; SPIKE; TOLLEFSON, 1991). Além disso, alticíneos e galerucíneos vêm sendo usados em estudos científicos de evolução, como o de escolha de hospedeiro (FARRELL; MITTER, 1990; FUTUYMA; MCCAFFERTY, 1990), ecologia química (METCALF, 1994; PASTEELS; ROWELL-RAHIER, 1991), evolução da farmacofagia (TALLAMY; MULLIN; FRAZIER, 1999; TALLAMY; GORSKI; BURZON, 2000), e outros mecanismos evolutivos (FARRELL; MITTER; FUTUYMA, 1992; MITTER; FARRELL, 1991) constituindo, portanto, um agrupamento de relevância biológica, evolutiva e econômica em que ainda não há um consenso de classificação (KIM; KJER; DUCKETT, 2003).

Latreille (1802) propôs, primeiramente, o grupo Galerucinae *sensu lato* como Galerucites incluindo os gêneros de Alticinae e Galerucinae. Jacoby (1908) separou os Alticinae como uma subfamília distinta. Muitos pesquisadores acreditam que Galerucinae e Alticinae formam um clado monofilético (BÖVING; CRAIGHEAD, 1931; CHAPUIS, 1875; CHEN, 1940; CROWSON; CROWSON, 1996; FURTH; SUZUKI, 1994; GRESSIT, 1942; JACOBY, 1908; JOLIVET, 1959; LATREILLE, 1802; LINGAFELTER; KONSTANTINOV, 1999; REID, 1995; SCHIMITT, 1996), formando Galerucinae *sensu lato*.

A abordagem formal mais antiga é suportada por duas apomorfias nos alticíneos, sendo os fêmures posteriores maiores e inflados com esclerito interno especializado (KONSTANTINOV, 1994; NEWMAN, 1835) e uma divisão na parte inferior do élitro denominada área de atrito (do termo em inglês *rubbing patch*) (SAMUELSON, 1994). A análise cladística dos caracteres morfológicos realizada por Lingafelter e Konstantinov (1999) e análise molecular isolada, ou combinada com os caracteres morfológicos revela uma hipótese alternativa com Alticinae sendo parafilético incluindo o grupo monofilético dos Galerucinae (DUCKETT; GILLESPIE; KJER, 2004; KIM; KJER; DUCKETT, 2003), ou reciprocamente grupos monofiléticos de Galerucinae e Alticinae (FARRELL, 1998; FARRELL; SEQUEIRA, 2004; GÓMEZ-ZURITA et al., 2007, 2008).

Diante do exposto não há, portanto um consenso quanto ao posicionamento, classificação ou monofilia dos Alticinae e nem de sua real relação com os Galerucinae *sensu stricto*. Estudos cladísticos realizados para se investigar as relações entre os alticíneos e os Galerucinae *sensu stricto* inferidos a partir de dados moleculares, dados morfológicos ou ainda os dois tipos de dados em uma abordagem combinada resultam em três classificações

conflitantes (KIM; KJER; DUCKETT, 2003).

A primeira das hipóteses proposta por Farrell (1998) utilizou uma combinação de dados moleculares de rRNA do 18S com dados morfológicos de Reid (1995), incluindo 6 gêneros de Galerucinae *sensu stricto* e 11 gêneros de Alticinae, e obteve uma filogenia onde Alticinae e Galerucinae (categorizados com subfamílias distintas) são grupos-irmãos monofiléticos, porém fracamente suportada, entretanto o objetivo de Farrell (1998) foi o de observar e comprovar a grande biodiversidade entre os besouros e não especificamente analisar as relações filogenéticas entre as subfamílias (KIM; KJER; DUCKETT, 2003). Por outro lado Suzuki e Furth (1992) e Furth e Suzuki (1994) examinaram gêneros que eram apenas “transicionais” ou “problemáticos”, ou seja, aqueles em que não se haviam caracteres suficientes para alocar tais gêneros em alticíneos ou em galerucíneos, ou seja, gêneros *incertae sedis* (KIM; KJER; DUCKETT, 2003); portanto, não oferecem uma boa perspectiva das relações dos dois grupos em sua totalidade.

Uma segunda hipótese considera Alticinae como um grupo parafilético enquanto suporta um grupo monofilético de Galerucinae, proposta por dois estudos: Reid (1995) e Crowson e Crowson (1996), utilizando nas análises alguns caracteres adultos e larvais. Reid (1995) propôs que Alticinae é poli ou parafilético baseado na facilidade de perda do mecanismo de salto e incluindo apenas um táxon, o Galerucinae *sensu lato* como parte de sua análise de relações entre as subfamílias de Chrysomelidae. Crowson e Crowson (1996) examinaram uma abrangente série de caracteres morfológicos para distinguir os Galerucinae verdadeiros dos Alticinae e rejeitaram a monofilia dos Alticinae. Esses autores concordaram fortemente com Böving e Craighead (1931) de que o estudo larval dos dois grupos era essencial para o entendimento da relação filogenética entre ambos (KIM; KJER; DUCKETT, 2003).

Uma terceira e conflitante hipótese foi proposta por Lingafelter e Konstantinov (1999), com Galerucinae sendo parafilético dando origem ao grupo Alticinae monofilético em seu interior, mas os autores reconheceram que a amostragem era muito pobre, e propuseram o nível taxonômico de tribo para Alticini.

Considerando esta problemática de classificação, neste estudo, quando se referindo aos alticíneos o fará seguindo a classificação proposta por Farrell (1998), onde Alticinae e Galerucinae são monofiléticos e grupos-irmãos a fim de evitar confusões quanto a nomenclatura.

## **1.2. Da ordem Siluriformes**

A superordem Ostariophysi está inserida na infraclasse Teleostei, sendo composta pelas ordens Gonorynchiformes (Série Anothophysii), Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes (Série Otophysi) (FINK E FINK, 1996).

Correspondendo a sexta maior ordem dos vertebrados (LUNDBERG, 1975; NELSON, 2006), e a segunda maior do Brasil, os Siluriformes possuem cerca de 36 famílias, com 478 gêneros e mais de 3000 espécies (FERRARIS, 2007; CUNHA, 2008), porém o número de famílias não é consensual e varia de acordo com visões sistemáticas de diferentes autores sendo que, por exemplo, o número de famílias reconhecidas é de 29 segundo Ferraris (1998), de 33 para Teugels (1996) e Eschmeyer (1998), 34 para Nelson (1994), 35 segundo Ferraris e De Pinna (1999), Britto (2003) e Nelson (2006) e 36 segundo Ferraris (2007).

Os peixes silurídeos distribuem-se pelas regiões Tropicais e Neotropicais, principalmente na América do Sul, Sul e Sudeste da Ásia e África (ARRATIA et al., 2003; BURGESS 1989; DE PINNA, 1998; FERRARIS 1998; TEUGELS 1996), tal distribuição acaba implicando em uma provável limitação biogeográfica regulada entre outros fatores, pela temperatura (NELSON, 2006; SOARES, 2008). A maioria das espécies ocorre em ambientes de água doce, porém as famílias Ariidae e Plotosidae possuem significativa representatividade em ambientes marinhos (BURGESS 1989; DE PINNA, 1998), sendo que destas famílias aproximadamente 117 espécies são de ambiente marinho (NELSON, 2006). Pimelodidae, Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae abrigam espécies estuarinas, que apresentam certa tolerância a ambientes salinos (DE PINNA, 1998).

Os representantes da ordem Siluriformes possuem grande variação anatômica, fisiológica e comportamental, o que lhes permite ocupar uma gama de nichos diferentes (SOARES, 2008). Possuem hábitos noturnos e crepusculares, levando-os a possuir a habilidade de habitar ambientes de água turva, como o fundo de rios, espaços entre rochas e vegetação (FERRARIS, 1998, 1997; SOARES, 2008), além de cavernas, ambientes subterrâneos, aquíferos e espaços intersticiais diminutos (LUNDBERG; FRIEL, 2003). Tais hábitos são garantidos principalmente pela presença de órgãos não-visuais como por exemplo os barbilhões e papilas táteis e gustativas distribuídas pela boca e pela pele, as quais são também utilizadas para localização de alimento (ALEXANDER, 1965; PAXTON; ESCHMEYER, 1998). Outros sistemas sensoriais desenvolvidos em alguns bagres incluem sentidos de gustação, de audição, recepção de vibração e eletro recepção (BRUTON, 1996).

Os Siluriformes não possuem escamas sobre o corpo, o que facilita a mobilidade física e também a respiração cutânea quando necessária para auxiliar a respiração aquática em algumas espécies (BRUTON, 1996).

Os nichos tróficos são geralmente amplos com grande porcentagem de sobreposição (BRUTON, 1996). Os hábitos alimentares são diversos incluindo espécies herbívoras, planctófagas, carnívoras, onívoras, xilófagas, lepidófagas (que se alimentam de escamas) e hematófagas (BRUTON, 1996; KELLEY; ATZ, 1964; MACHADO; SAZIMA, 1983; NELSON, 2006). Há também espécies parasitas, dentre as quais algumas urinófilas, no caso a espécie *Vandellia cirrhosa* que é o único vertebrado a parasitar o ser humano, e o faz na cavidade uretral (BRUTON, 1996).

O monofiletismo da ordem Siluriformes é bem corroborado por diversos estudos, baseados em complexos anatômicos sinapomórficos, sendo consensual entre vários autores (ARRATIA, 1987, 1992; ARRATIA et al., 2003; DE PINNA, 1993; FINK; FINK, 1981, 1996; MO, 1991). Sullivan; Lundberg e Hardman (2006) confirmaram a monofilia de Siluriformes e da superfamília Loricarioidea através de dados moleculares com os genes RAG1 e RAG2.

O grupo apresenta inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos devido principalmente à grande diversidade taxonômica sendo que a elucidação das relações filogenéticas dos grupos de Siluriformes é considerada por De Pinna (1998) como o maior problema na sistemática de Peixes.

A maioria dos estudos cladísticos de Siluriformes é dedicada aos intra-relacionamentos de famílias de silurídeos (DIOGO, 2003), sendo poucos os trabalhos que verificam as relações dos grandes grupos da ordem (BRITTO, 2003).

Os principais trabalhos com resolução taxonômica no nível de famílias são o de Mo (1991), De Pinna (1993, 1998), Diogo (2004, 2008), Britto (2003) e Sullivan; Lundberg e Hardman (2006), sendo que esses trabalhos utilizaram diversos caracteres morfológicos, enquanto Sullivan; Lundberg e Hardman (2006) utilizaram o alinhamento de dados moleculares referentes a genes nucleares (RAG 1 e RAG 2).

### **1.3. Do Método de Construção de Super Árvore (Supertree Construction)**

O método de Super Árvore representa uma abordagem capaz de gerar filogenias mais compreensíveis através da combinação das informações filogenéticas já existentes (BININDA-EMONDS; GITTLEMAN; STEEL, 2002; BININDA-EMONS, 2004;

SANDERSON; PURVIS; HENZE, 1998). O conceito do método e a formalização do termo foram primeiramente introduzidos por Gordon (1986) e desde então a técnica vem sendo aperfeiçoada (SANDERSON; PURVIS; HENZE, 1998; WILKINSON et al., 2001). Através da utilização de algoritmos formais, este método baseia-se na sobreposição de árvores de origem, que foram inferidas através de conjuntos de dados independentes (GATESY et al., 2002), usando dados já publicados ou incorporados a bancos de dados. Estudos de simulações têm demonstrado que super árvores construídas com um número satisfatório de árvores de origem e que estas sejam abrangentes suficientemente podem representar a informação provida pelas árvores filogenéticas com a exatidão de origem (BININDA-EMONDS; SANDERSON, 2001; LEVASSEUR; LAPOINTE, 2003; PIAGGIO-TALICE et al., 2004).

O objetivo desta técnica é criar uma matriz passível de análise filogenética com base na sobreposição da informação de diferentes árvores de origem, e para se atingir tal objetivo são disponibilizados diversos métodos (BININDA-EMONDS; GITTLEMAN; STEEL, 2002; CREEVEY; McINERNEY, 2005). São quatro as principais abordagens para construção de Super Árvores sendo elas: (1) *Super-tree with maximum similarity – Most Similar supertree* (MSS) (Super Árvore com máxima similaridade – Super Árvore de maior similaridade); (2) *Maximum Quartet Fit* (QFIT); (3) *Maximum Splits Fit* (IFCT) e (4) *Matrix Representation using Parsimony* (MRP) (Representação de Matriz usando Parcimônia), este último podendo ser utilizado quando as árvores *inputs* são ou não congruentes (SANDERSON; PURVIS; HENZE, 1998).

Uma opção de algoritmo existente é combinar as árvores, ao invés dos dados primários resultante de estudos filogenéticos múltiplos, de maneira semelhante à meta análise (ARNQVIST; WOOSTER, 1995; SANDERSON; PURVIS; HENZE, 1998).

No método de Representação de Matriz usando Parcimônia (MRP) é criada uma matriz única originária da sobreposição das informações contidas nas árvores de origem, para isso é utilizado o esquema aditivo e binário proposto por Baum (1992) e Ragan (1992), onde as linhas representam cada táxon e as colunas representam cada ramo interno de cada árvore de origem. É atribuído ao táxon “1” ou “0” de acordo com o grupo que se encontra a hipótese de parentesco na árvore de origem e é atribuído o sinal “?” se o táxon não está presente no *input*. É nesta matriz que é aplicado o critério parcimonioso (BININDA-EMONDS et al., 2004).

Recentemente, super árvores usando métodos formais foram inferidas para importantes grupos, como Mammalia (LIU et al., 2001), Chiroptera (JONES et al., 2002), Sphyrnidae (CAVALCANTI, 2007), Dinosauria (PISANI et al., 2002), Charadriiformes

(THOMAS; WILLS; SZÉKELY, 2004), Caenophidia (KELLY; BARKER; VILLET, 2003), Crocodilia (GATESY; BAKER; HAYASHI, 2004), Procellariiformes (KENNEDY; PAGE, 2002), Artiodactyla (MAHON, 2004), Carnivora (BININDA-EMONDS; GITTLEMAN; PURVIS, 1999), Marsupialia (CARDILLO; BROMHAM 2001), Primates (PURVIS, 1995; PURVIS; WEBSTER, 1999), Lagomorpha (STONER; BININDA-EMONDS; CARO, 2003), Angiospermas (DAVIES et al., 2004; PLUNKETT, 2001), Bacteria (DAUBIN; GOUI; PERRIÈRE, 2001; DAUBIN; GOUI; PERRIÈRE, 2002; GALTIER; GOUY, 1994), Metazoa (ZRZAVY ; RICAN, 2003) e para o gênero *Schistosoma* (MORAND; MULLER-GRAF, 2000).

A abordagem de construção de super árvores, é o único método filogenético com fundamentação algorítmica e implementação computacional para a construção de filogenias com clados extensos, e incluindo centenas de espécies (BININDA-EMONDS, 2004). Super árvores têm sido utilizadas para investigações quanto a modelos evolutivos, cladogênese, padrões evolutivos, biologia comparada, biodiversidade e conservação (BININDA-EMONDS, 2004). A técnica, porém, não é consensual entre filogeneticistas e taxonomistas, sendo que as principais críticas baseiam-se em problemas metodológicos, sendo elas: a diferença entre a contribuição de cada grupo de dados independentes; a pseudoreplicação entre os grupos de dados, onde os mesmos caracteres podem contribuir em diferentes árvores utilizadas como *inputs*; e a validação de super árvores como hipóteses filogenéticas.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando-se a problemática da resolução das relações filogenéticas entre os grupos em foco: Galerucinae (Coleoptera) e Siluriformes (Teleostei) e a grande e crescente quantidade de dados filogenéticos divergentes publicados, e a falta de abordagem de junção de tais informações, e que os grupos possuem grande importância ecológica e econômica o presente trabalho teve com objetivo:

- Construir filogenias originais para galerucíneos neotropicais, para os quais ainda não há disponibilidade de dados na literatura, a partir do sequenciamento de um gene nuclear (28S-D2) e um mitocondrial (COI), amplamente utilizados em estudos filogenéticos, aumentando assim a resolução da super árvore e disponibilizando as sequências de tais organismos em bancos de dados para estudos posteriores.
- Inferir relações filogenéticas mais amplas e baseadas em maior quantidade de dados, tanto morfológicos quanto moleculares, para os grupos de interesse (Galerucinae *sensu lato* e Siluriformes) através do método da super árvore, buscando maior abrangência e compreensão taxonômica para os grupos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

Foram analisadas as sequências referentes a 2 genes de 11 espécies de coleópteros da subfamília Galerucinae *sensu lato*, pertencentes a família Chrysomelidae (Tabela 1) sendo um gene nuclear, o gene para rDNA 28S-D2 (LSU) e um gene mitocondrial, Citocromo Oxidase subunidade I (COI). As espécies utilizadas no estudo estão apresentadas na Figura 2.

Os espécimes utilizados no estudo foram coletados e armazenados imediatamente em álcool 95% à -20 °C. As coordenadas dos pontos de coleta estão resumidas na Tabela 2, sendo que as espécies analisadas têm distribuição principalmente na região do sul brasileiro (Figura 3).

**Tabela 1** - Lista de espécies da subfamília Galerucinae *sensu lato* analisadas, suas respectivas categorias taxonômicas, as espécies utilizadas como grupos-externos e os genes sequenciados para cada espécie. O número de Identificação (ID) refere-se ao número de armazenamento do espécime.

| Subfamília             | Espécies                               | ID       | COI | 28 S |
|------------------------|----------------------------------------|----------|-----|------|
| <b>Alticinae</b>       | <i>Omophoita communis</i> Bechyne      | 997      | X   | X    |
|                        | <i>Omophoita sexnotata</i> Harold      | 934      | -   | X    |
|                        | <i>Alagoasa florigera</i> Harold       | 679      | X   | X    |
|                        | <i>Systema tenuis</i> Bechyne          | 1079     | X   | X    |
|                        | <i>Megistops vandepolli</i> Duvivier   | 528/1028 | X   | X    |
|                        | <i>Wanderbiltiana festiva</i> (Germar) | 1083     | X   | X    |
|                        | <i>Heikertingerella argentinensis</i>  | 772      | X   | X    |
|                        | <i>Pleurasphaera decipiens</i> Klug.   | 894      | X   | X    |
| <b>Grupos-externos</b> |                                        |          |     |      |
| <b>Chrysomelinae</b>   | <i>Phaedon confinis</i> Bechyne        | Δ26      | X   | X    |
| <b>Cassidinae</b>      | <i>Stolas chalybaea</i> (Germar)       | Stolas   | X   | X    |
| <b>Eumolpinae</b>      | <i>Eumolpus</i> sp.                    | 1451     | X   | X    |

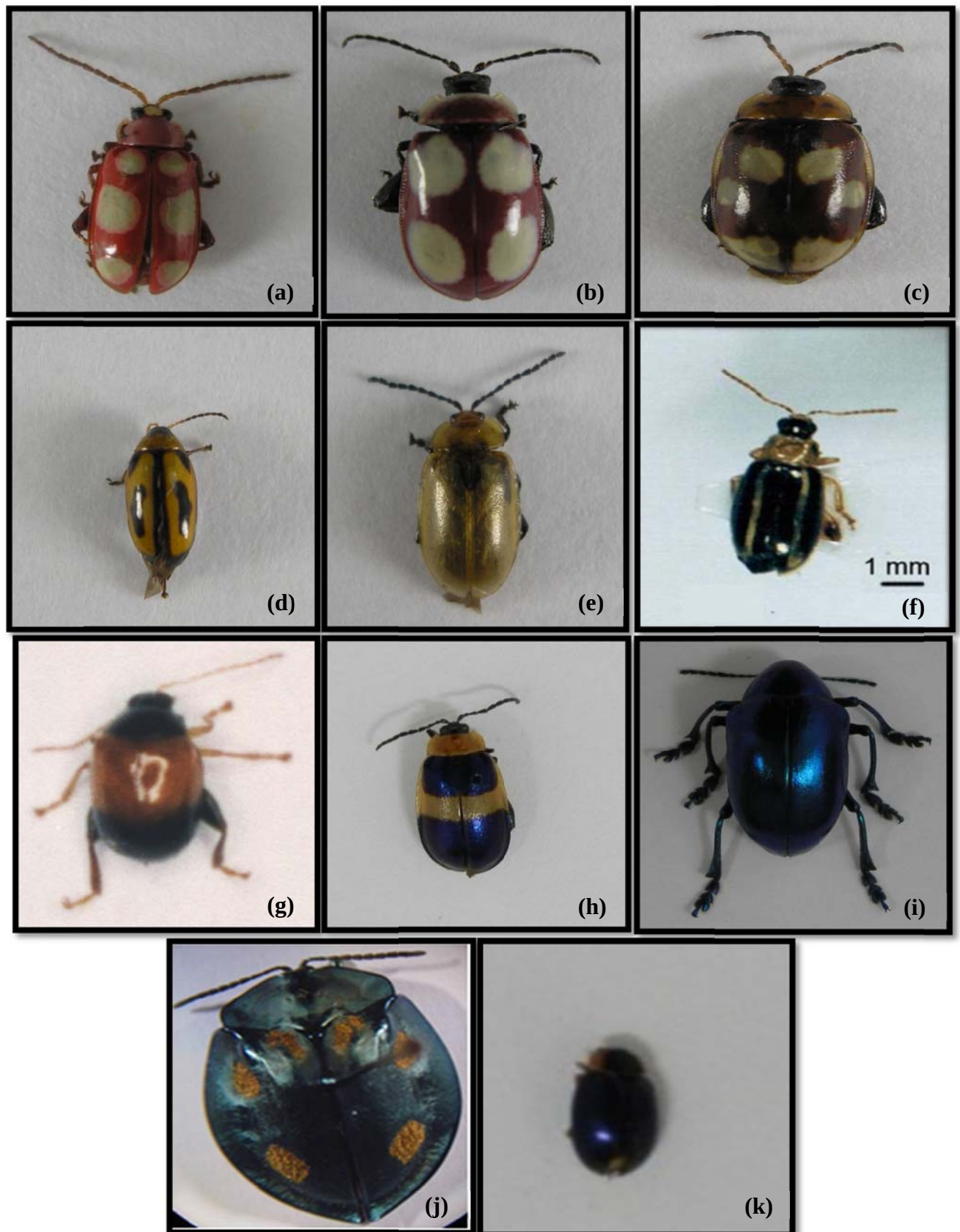


**Figura 2** – Espécies de coleópteros utilizados no estudo filogenético. (a) *Omophoita sexnotata* (b) *Omophoita communis*; (c) *Alagoasa florigera* (d) *Megistops vandepolli*; (e) *Pleurasphaera decipiens*; (f) *Systema tenuis*; (g) *Heikertingerella argentinensis*; (h) *Wanderbiltiana festiva*; (i) *Eumolpus* sp.; (j) *Stolas chalybae*; (k) *Phaedon confinis*.

**Tabela 2** - Locais de coleta, com a descrição da cidade e das coordenadas de GPS.

| <b>Espécies</b>                                                                                          | <b>Localização</b> | <b>Cidade</b>        | <b>Coordenadas<br/>GPS</b>   | <b>Ponto</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|--------------|
| <i>Omophoita sexnotata</i> ,<br><i>Heikertingerella argentinensis</i> ,<br><i>Wanderbiltiana festiva</i> | Passo do Pupo      | Itaiacoca<br>PR      | – S 25°08'48"<br>W 49°58'58" | 1            |
| <i>Alagoasa florigera</i> ,                                                                              | Fazenda Escola     | Ponta Grossa<br>– PR | S 25°05'04"<br>W 50°05'03"   | 2            |
| <i>Systema tenuis</i>                                                                                    | Fazenda<br>Osmar   | Sr. Itaiacoca<br>PR  | – S 25°08'36"<br>W 49°51'56" | 3            |
| <i>Phaedon confinis</i>                                                                                  | Teixeira Mendes    | Ponta Grossa<br>– PR | S 25°05'40"<br>W 50°06'49"   | 4            |
| <i>Eumolpus sp.</i>                                                                                      | Bloco L, UEPG      | Ponta Grossa<br>– PR | S 25°05'49"<br>W 50°06'32"   | 5            |
| <i>Omophoita communis</i> ,<br><i>Pleurasphaera decipiens</i>                                            | Hípica             | Nonoai – RS          | S 27°23'25"<br>W 52°44'09"   | 6            |
| <i>Megistops vandepolli</i> ,<br><i>Stolas chalybaea</i>                                                 | Nonoai             | Nonoai – RS          | S 27°23'43"<br>W 52°46'26"   | 7            |



**Figura 3** - (a) Mapa do sul do Brasil, com a localização das cidades onde foram realizadas as coletas, (b) pontos específicos de coleta no estado do Paraná, (c) pontos específicos de coleta no estado do Rio Grande do Sul.

## 3.2. Metodologias

### 3.2.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração com CTAB de Murray e Thompson (1980), com modificações.

Para obtenção do DNA genômico foram utilizados tecidos dos coleópteros analisados, exclusivamente provenientes da cabeça, pronoto e fêmures, sendo que o restante do corpo foi guardado na coleção entomológica do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa (com identificação dos espécimes realizada por Carlos Campaner do Museu de Zoologia da USP). Os tecidos foram individualmente colocados em tubos de centrífuga (Eppendorf) de 1,5 mL e imersos em nitrogênio líquido. O conteúdo (tecido + nitrogênio) foi rapidamente macerado utilizando-se de bastões com pontas esterilizadas.

Aos tubos com os tecidos macerados foram adicionados 180 µL de tampão sem CTAB (5mL de NaCl 5M; 5 mL de EDTA 0,5 M; 5 mL de TRIS-HCl pH 8.0); 120 µL de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) 5%; 150 µL de Proteinase K (10 mg/mL); 5 µL de β-Mercaptoetanol. A seguir os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C *overnight*.

Após a completa digestão do tecido foi adicionado 10 µL de RNase (10 mg/mL). Incubados em banho-maria a 37 °C por 2 horas, sendo que neste período de tempo os tubos foram agitados ocasionalmente.

Após a incubação foi adicionado 600 µL de clorofórmio, com inversão suave. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 8.000 rpm com a temperatura da centrífuga a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 600 µL de etanol 100% gelado e incubado a -20 °C por 2 horas.

Foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi descartado, e os *pellets* lavados com 200 µL de etanol 70% gelado. Novamente os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 10.000 rpm a 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados com 200 µL de etanol 100%, gelado.

Foi realizada centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos a 4 °C, com descarte dos sobrenadantes. Os tubos foram armazenados em estufa a 37 °C para secagem. Posteriormente, o conteúdo de cada tubo foi ressuspenso em 40 µL de água mili-Q.

### 3.2.2. PCR e Sequenciamento

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada para um volume final de 100  $\mu$ L para os dois genes em questão (COI e 28S-D2) nas seguintes concentrações: 20 ng/ $\mu$ L de DNA genômico; Tampão de Reação 1X; 1 U/ $\mu$ L de Taq Polymerase (Invitrogen®); 1,5 Mm de  $MgCl_2$ ; 0,2 mM de mix de dNTPs (Invitrogen®) e 2,0 mM de cada *primer*. Os *primers* utilizados no processo de amplificação estão resumidos na Tabela 3.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador com sistema de aquecimento da tampa, a fim de evitar evaporação, nas seguintes condições: um passo inicial a 96 °C por 4 minutos para desnaturação e abertura da fita, seguido de 40 ciclos com 3 passos, sendo o primeiro de 95 °C por 30 segundos, o segundo de 50 °C por 45 segundos para anelamento dos *primers* e o terceiro a 72°C para renaturação e extensão do DNA. Finalmente um passo a 72 °C por 10 minutos para renaturação e extensão final da fita de DNA.

Os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com Gel Read Biotium® (1:1000) para confirmação da amplificação.

Os produtos de PCR contendo os amplicons foram purificados utilizando o kit de Purificação Illustra TFX™ GE, conforme instruções do fabricante.

**Tabela 3 -** *Primers* utilizados na amplificação das regiões desejadas.

| Gene        | Origem        | Sequência (5' - 3')            |
|-------------|---------------|--------------------------------|
| COI         | Mitochondrial | F – TAATTGGAGGATTTGGWAAYT G    |
|             |               | R – CCYGGTAAAATTTAAATATAAACTTC |
| 28S-D2 rDNA | Nuclear       | F – ACCCGAAAGGTCGAAAGG         |
|             |               | R – GATCGGCGTTTCAACGAG         |

O sequenciamento foi realizado a partir do produto final de PCR em uma reação com 5 pMol de *primer Forward* e 5 pMol de *primer Reverse* e 60 ng/ $\mu$ L de produto de PCR purificado utilizando-se um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

A edição dos nucleotídeos foi realizada utilizando as sequências já publicadas em banco de dados (GenBank NCBI) como referência (Tabela 4).

### 3.2.3. Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

As sequências foram alinhadas no programa ClustalW implementado no pacote BioEdit versão 7.1.3/2011 (HALL, 1999) e MEGA (TAMURA et al., 2011) com os parâmetros para abertura de gap utilizando o modo *default* do *software*. Os alinhamentos das sequências foram analisados no PAUP\* 4.0b10 (SWOFFORD, 2004). As análises de parcimônia foram conduzidas com 1000 replicações, com busca de *branch swapping* no modo “TBR” (*Tree-Bisection-Reconnection*), com todos os caracteres sendo pesados igualmente e não ordenados. O suporte para os ramos foi acessado por meio da implementação de *bootstrap* não paramétrico (FELSENSTEIN, 1985) com 500 replicações cada uma compreendendo 100 buscas heurísticas adicionadas randomicamente.

### 3.2.4. Análises Filogenéticas Consensuais – “Supertree Construction”

Para a construção de super árvores filogenéticas foram colecionadas filogenias inferidas para Chrysomelidae que incluíssem em suas amostragens táxons relacionados aos grupos em investigação, ou seja, de alticíneos e galerucíneos e filogenias para a ordem Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). A pesquisa por cladogramas foi efetuada utilizando as palavras-chave: alticin\*, galerucin\*, chrysomelidae, phylogen\*, e systematic\* para os Chrysomelidae e Siluriformes, phylogen\*, systematic para os Siluriformes, nos diversos indexadores e bancos de dados.

Foram colecionadas ao final da revisão bibliográfica 20 árvores-fonte contendo em suas topologias hipóteses evolutivas para a sistemática dos Chrysomelidae e 11 árvores-fonte para os Siluriformes.

Nas 20 árvores-fonte colecionadas para os insetos foram relacionados ao todo 189 gêneros de alticíneos e galerucíneos. Um arquivo no formato Nexus contendo todos os 189 táxons relacionados, mais Chrysomelinae adicionada como grupo externo foi criado. A partir desta árvore com todos os 190 táxons terminais em relação de politomia as hipóteses evolutivas (topologias) das árvores-fonte foram editadas individualmente. A inclusão de todos os táxons na análise acaba por evitar ou ao menos diminuir possíveis conflitos na análise filogenética posterior.

De forma semelhante foram encontradas 43 famílias de Siluriformes nas árvores fonte, que foram incluídas em uma topologia inicial em politomia e a partir desta situação as hipóteses evolutivas filogenéticas foram reproduzidas. Todas as árvores *inputs* editadas foram

enraizadas por seus respectivos *outgroups*.

**Tabela 4** - Lista de espécies cujas sequências foram utilizadas neste trabalho com seus respectivos Números de Acesso no GenBank.

| <b>Espécie</b>                              | <b>COI</b> | <b>28S-D2</b> |
|---------------------------------------------|------------|---------------|
| <i>Orsodacne atra</i> Ahrens                | AY171396   | AY171422      |
| <i>Syneta adamsi</i> Baly                   | AY171414   | AY171441      |
| <i>Chrysomela tremulae</i> Fabricius        | AY171397   | AY171423      |
| <i>Chrysolina coerulans</i> (Scriba)        | AY171403   | AY171429      |
| <i>Paropsis porosa</i> Erichson             | AY171411   | AY171438      |
| <i>Zygogramma piceicollis</i> Stål          | AY171413   | AY171440      |
| <i>Timarcha tenebricosa</i> Fabricius       | AY171412   | AY171439      |
| <i>Altica</i> sp.                           | AY171398   | AY171424      |
| <i>Allochroma</i> sp.                       | AY171402   | AY171428      |
| <i>Chaectocnema costulata</i> (Motschulsky) | AY171404   | AY171431      |
| <i>Disonycha conjunta</i> (Fabricius)       | AY171407   | AY171434      |
| <i>Blepharida rhois</i> Förster             | AY171408   | AY171435      |
| <i>Dibolia borealis</i> Chevrolat           | AY171415   | AY171442      |
| <i>Sangariola fortunei</i> (Baly)           | AY171416   | AY171443      |
| <i>Systema bifasciata</i> Jacoby            | AY171405   | AY171432      |
| <i>Orthaltica copalina</i> Fabricius        | AY171410   | AY171437      |
| <i>Oides decempunctata</i> (Billberg)       | AY171421   | AY171448      |
| <i>Galeruca rudis</i> LeConte               | AY171409   | AY171436      |
| <i>Monocesta depressa</i> Clark             | AY171406   | AY171433      |
| <i>Diorhabda elongata</i> (Brullé)          | AY171419   | AY171446      |
| <i>Schematiza flavofasciata</i> (Klug)      | AY171420   | AY171447      |
| <i>Aulacophora indica</i> (Gmelin)          | AY171417   | AY171444      |
| <i>Phyllobrotica</i> sp.                    | AY171401   | AY171427      |
| <i>Agelastica coerulea</i> Baly             | AY171399   | AY171425      |
| <i>Monolepta nigrotibialis</i> Jacoby       | AY171400   | AY171426      |

As árvores editadas foram agrupadas e submetidas ao software de criação de super árvores, CLANN (CREEVEY; McINNERNEY, 2003), sendo originadas matrizes binárias resultantes da sobreposição das árvores-fonte colecionadas para cada grupo. Tal matriz foi analisada no PAUP\* (SWOFFORD, 2004) através de máxima parcimônia, com busca heurística com 1000 replicações, com algoritmo de *branch swapping* no modo SPR (*Sub tree Prunning and re-grafting*), adição de sequência randômica.

## **4. RESULTADOS**

Os resultados estão organizados em dois capítulos referentes aos artigos científicos.

### **4.1. Capítulo I**

**Filogenia Molecular para Galerucinae *sensu lato* com ênfase na tribo Oedionychini (Chrysomelidae: Alticinae) baseado nos genes Citocromo Oxidase I e 28S-D2 rDNA**

### **4.2. Capítulo II**

**Análise filogenética consensual para Galerucinae *sensu lato* (Coleoptera: Chrysomelidae) contemplando dados morfológicos e moleculares**

### **4.3. Capítulo III**

**Super Árvore Filogenética de Nível Superior para a ordem Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) reunindo dados morfológicos e moleculares**

## 4.1. Capítulo I

### Filogenia Molecular para Galerucinae *sensu lato* com ênfase na tribo Oedionychini (Chrysomelidae: Alticinae) baseado nos genes Citocromo Oxidase I e 28S-D2 rDNA

#### Resumo

A subfamília Galerucinae *sensu lato* é um importante agrupamento dentro da família Chrysomelidae, possuindo em seu interior duas ramificações principais, os galerucíneos verdadeiros, ou Galerucinae *sensu stricto*, e os alticíneos, Alticinae. Análises filogenéticas comprovam a estrita relação entre galerucíneos e alticíneos, porém, não há um consenso quanto à monofilia recíproca destes dois grupos, nem quanto ao real posicionamento sistemático entre eles, sendo Alticinae, ora alocada como uma subfamília distinta dos demais Galerucinae, ora alocada como uma tribo subordinada aos galerucíneos. Devido a este complexo quadro de resolução filogenética, e a importância econômica, evolutiva, genética, biológica e ecológica desses dois grupos, devido também a grande diversidade de ambos, abrigando milhares de espécies, faz-se necessário estudos filogenéticos contemplando espécies que são pouco estudadas, como por exemplo, representantes da fauna de Alticinae da América do Sul, a qual é a mais diversa e mais abundante em comparação às outras regiões do globo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi inferir uma hipótese filogenética para espécies de Alticinae ocorrentes na América do Sul, com ênfase na amostragem de representantes da tribo Oedionychini. As análises filogenéticas foram inferidas através do alinhamento de sequências do segmento de expansão 2 do gene 28S-D2 rDNA e região parcial do gene mitocondrial para Citocromo Oxidase C Subunidade I (COI), agrupando estes novos dados moleculares a outros dados disponíveis na literatura, referentes a espécies próximas, porém com ocorrência na região Neártica, para oferecer uma perspectiva mais abrangente da filogenia do grupo. Os resultados recuperam a monofilia da tribo Oedionychini, que é um agrupamento com características citogenéticas e evolutivas peculiares dentro dos Alticinae. Em um nível mais basal a análise aponta para a formação de um grupo Galerucinae monofilético, com Alticinae tendendo a parafilia, porém com poucos passos adicionais para recuperação da monofilia entre Alticinae e Galerucinae.

**Palavras-chave:** Alticini. Coleoptera. Evolução. Meta análise. Sistemática.

## Introdução

*Galerucinae sensu lato*, é uma das subfamílias de Chrysomelidae, e possui dois agrupamentos principais, sendo um dos galerucíneos verdadeiros, ou *Galerucinae sensu stricto*, e outro dos alticíneos, ou Alticinae.

*Galerucinae sensu stricto* possui mais de 5.800 espécies, agrupados em 488 gêneros, enquanto os Alticinae, possuem aproximadamente 8.000 espécies em mais de 560 gêneros (KIM; KJER; DUCKETT, 2003; SEENO; WILCOX, 1982). Assim o Complexo *Galerucinae sensu lato* possui mais de 13.000 espécies representando o maior grupo dentro de Chrysomelidae (RILEY et al, 2002; GILLESPIE et al., 2008).

Não há um consenso filogenético quanto ao reconhecimento da monofilia recíproca destes dois grupos ou, ainda, quanto ao real posicionamento dos relacionamentos mais apicais dentro da filogenia da subfamília. Porém são notoriamente agrupamentos distintos por diferenças morfológicas, como a implantação de soquetes antenais mais próximos nos *Galerucinae sensu stricto* do que nos Alticinae (NEWMAN, 1845), a existência de uma estrutura de atrito nos Alticinae (*rubbing patch*) (SAMUELSON, 1994), e a capacidade de pulo dos alticíneos, conferida pelo fêmur traseiro dilatado (KONSTANTINOV, 1994; NEWMAN, 1835). Entretanto esta habilidade de salto não é comum a todos os Alticinae como, por exemplo, em alguns gêneros transicionais (SUZUKI; FURTH, 1992; FURTH; SUZUKI, 1994). Apesar destas diferenças, esses dois grupos são reconhecidamente clados relacionados filogeneticamente (BÖVING; CRAIGHEAD, 1931; CHAPUIS, 1875; CHEN, 1940; CROWSON; CROWSON, 1996; FURTH; SUZUKI, 1994; GILLESPIE et al., 2008; GÓMEZ-ZURITA et al., 2007, 2008; GRESSIT, 1942, JACOBY, 1908; JOLIVET, 1959; KIM; KJER; DUCKETT, 2003; LATREILLE, 1802; LINGAFELTER; KONSTANTINOV, 1999; REID, 1995; SCHIMITT, 1996).

Análises moleculares e morfológicas propõem, basicamente, três abordagens conflitantes de classificação, sendo elas: (a) Alticinae e *Galerucinae* reciprocamente monofiléticos, (b) *Galerucinae* sendo monofilético originando Alticinae parafilético e (c) Alticinae sendo monofilético e *Galerucinae* parafilético (BÖVING; CRAIGHEAD, 1931; CROWSON; CROWSON, 1996; DUCKETT; GILLESPIE; KJER, 2004; KIM; KJER; DUCKETT, 2003; FARRELL, 1998; FURTH; SUZUKI, 1994; GILLESPIE et al., 2008; LINGAFELTER; KONSTANTINOV, 1999 ; REID, 1995; SUZUKI; FURTH, 1992;). Os alticíneos, devido a esta falta de resolução filogenética, já foram alocados como uma subfamília distinta dos *Galerucinae sensu stricto*, assim como também já foram considerados

como uma tribo dentro desta subfamília. Considerando esta problemática de classificação, este estudo quando se referindo aos Alticinae o faz seguindo a classificação proposta por Farrell (1998), onde Alticinae e Galerucinae são monofiléticos e grupos-irmãos a fim de evitar confusões.

O agrupamento formado por Galerucinae *sensu stricto* e Alticinae abriga importantes espécies, que são utilizadas como modelos de padrões evolutivos (FARRELL; MITTER, 1990; FARRELL; MITTER; FUTUYMA, 1992; FUTUYMA; MCCAFFERTY, 1990; METCALF, 1994; MITTER; FARRELL, 1991; PASTEELS; ROWELL-RAHIER, 1991; TALLAMY; MULLIN; FRAZIER, 1999; TALLAMY; GORSKI; BURZON, 2000), e também espécies praga, que causam danos bilionários à agricultura (GILLESPIE et al., 2008; METCALF, 1994; SPIKE; TOLLEFSON, 1991). Além disso, Alticinae possui interessantes características que tem relevância no contexto evolutivo, como por exemplo, variações no número cromossômico, redução no número de células por espermatócitos, aumento de tamanho dos espermatócitos, e aumento no tamanho dos cromossomos sexuais, além de peculiaridades no processo de diferenciação destes cromossomos sexuais, tornando-os assinápticos (ALMEIDA et al., 2010; PETIPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

Oedionychini é uma das tribos dos Alticinae, possui espécies distribuídas principalmente na Região Neotropical, e agrupa duas ramificações principais, Disonychina e Oedionychina, sendo esta divisão suportada por embasamentos morfológicos e citogenéticos (BECHYNÉ; SPRINGLOVÁ DE BECHYNÉ, 1966; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY E CLARK, 1991).

A maior diversidade de alticíneos, quanto a espécies e gêneros, encontra-se na região Neotropical, sendo que a maioria dos gêneros que ocorrem na América do Sul é endêmica, à exceção dos gêneros *Chaetocnema*, *Epitrix*, *Longitarsus* e *Terpnochlorus*, os quais são cosmopolitas (SCHERER, 1988).

O objetivo deste trabalho foi reconstruir a filogenia molecular para espécies da tribo Oedionychini, que não foram, ou que foram apenas parcialmente contempladas em estudos filogenéticos anteriores, agrupando a informação gerada com outras depositadas em bancos de dados, oferecendo uma perspectiva mais ampla para a filogenia do grupo.

## Material e Métodos

Foram analisadas as sequências moleculares de dois genes, sendo um mitocondrial,

Citocromo Oxidase I (COI) e um nuclear, o segmento de expansão 2 do gene 28S rDNA (28S-D2), para 11 espécies da subfamília Galerucinae *sensu lato*, a maioria pertencente a tribo Oedionychini. As espécies amostradas estão resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Lista das espécies da subfamília Galerucinae *sensu lato* analisadas, e as espécies utilizadas como grupos-externos.

| Subfamília             | Espécies                              | ID     | COI | 28 S | Local coleta                 |
|------------------------|---------------------------------------|--------|-----|------|------------------------------|
| <b>Alticinae</b>       | <i>Omophoita communis</i> *           | 997    | X   | X    | S 27°23'25''<br>W 52°44'09'' |
|                        | <i>Omophoita sexnotata</i> *          | 934    | —   | X    | S 25°08'48''<br>W 49°58'58'' |
|                        | <i>Alagoasa florigera</i> *           | 679    | X   | X    | S 25°05'04''<br>W 50°05'03'' |
|                        | <i>Systema tenuis</i>                 | 1079   | X   | X    | S 25°08'36''<br>W 49°51'56'' |
|                        | <i>Megistops vandepolli</i>           | 528    | X   | X    | S 27°23'43''<br>W 52°46'26'' |
|                        | <i>Wanderbiltiana festiva</i> *       | 1083   | X   | X    | S 25°07'10''<br>W 49°56'24'' |
|                        | <i>Heikertingerella argentinensis</i> | 772    | X   | X    | S 25°07'20''<br>W 49°56'04'' |
|                        | <i>Pleurasphaera decipiens</i> *      | 894    | X   | X    | S 27°23'25''<br>W 52°44'09'' |
| <b>Grupos-externos</b> |                                       |        |     |      |                              |
| <b>Chrysomelinae</b>   | <i>Phaedon confinis</i>               | Δ26    | X   | X    | S 25°05'40''<br>W 50°06'49'' |
| <b>Cassidinae</b>      | <i>Stolas chalybaea</i>               | Stolas | X   | X    | S 27°23'43''<br>W 52°46'26'' |
| <b>Eumolpinae</b>      | <i>Eumolpus sp.</i>                   | 1451   | X   | X    | S 25°05'49''<br>W 50°06'32'' |

\* Espécies referentes à tribo Oedionychini.

Para a Extração de DNA foi utilizado o protocolo de Murray e Thompson (1980), com modificações, utilizando o tecido da cabeça, pronoto e fêmur dos espécimes, macerados em nitrogênio líquido.

Para acessar as sequências foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos alvos utilizando os *primers* contidos na Tabela 2. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com sistema de aquecimento da tampa, para evitar evaporação, nas seguintes condições: um passo inicial a 96 °C por 4 minutos para desnaturação e abertura da fita, seguido de 40 ciclos com 3 passos, sendo o primeiro de 95 °C por 30 segundos, o segundo de 50 °C por 45 segundos para anelamento dos *primers* e o terceiro a 72 °C para renaturação e extensão do DNA. Finalmente um passo a 72 °C por 10 minutos para renaturação e extensão final da fita de DNA. O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos finais de PCR purificados com Kit de Purificação Illustra TFX™ GE, conforme instruções do fabricante, com volume final de 60 ng/μL de DNA em um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

**Tabela 2 -** Sequência dos *primers* utilizados na amplificação das regiões específicas para COI e 28S-D2 rDNA.

| Gene        | Origem        | Sequência (5' - 3')            |
|-------------|---------------|--------------------------------|
| COI         | Mitochondrial | F – TAATTGGAGGATTTGGWAAYT G    |
|             |               | R – CCYGGTAAAATTAAAATATAAACTTC |
| 28S-D2 rDNA | Nuclear       | F – ACCCGAAAGGTCGAAAGG         |
|             |               | R – GATCGGCGTTTCAACGAG         |

Foram realizadas buscas nas sequências a procura de regiões de *stop codons*. A análise da composição das sequências foi realizada utilizando o pacote BioEdit 7.1 (HALL, 1999) e está contida na Tabela 3.

O alinhamento global das sequências foi realizado através do software MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011), utilizando os parâmetros de abertura e peso de *gaps* no modo *default*. As sequências depositadas em bancos de dados foram utilizadas para guiar o processo de alinhamento. Os alinhamentos encontram-se nos apêndices A (28S-D2) E B (COI).

A análise filogenética foi conduzida utilizando o PAUP\* 4.0b10 (SWOFFORD, 2004), com 1000 replicações com dados não ordenados, em um algoritmo de *branch swapping* no

modo TBR, com a opção *MulTrees* ativada e a opção *steepest descent* desativada. A análise de *bootstrap* não paramétrico (FELSENTEIN, 1985) foi conduzida utilizando 1000 replicações.

## Resultados e Discussão

A análise filogenética de Galerucinae *sensu lato* com base no gene 28S-D2 e na análise conjunta incluindo os dados do gene COI mostra uma topologia que recupera um grupo monofilético de Galerucinae *sensu stricto*, e falha na recuperação da monofilia de Alticinae, que parece ser parafilética, com o posicionamento de *Disonycha conjunta* no interior de Galerucinae *sensu stricto* (Figuras 1 e 2), resultados concordantes com as análises de Reid (1995), Kim; Kjer e Duckett (2003), entre outros.

A topologia falha em posicionar *Disonycha conjunta* dentro de Alticinae, porém a filogenia de Lingafelter e Konstantinov (1999) coloca *Disonycha* como segundo Alticinae mais basal, sendo estes resultados congruentes com os do alinhamento do rRNA 28S-D2 descritos por Kim; Kjer e Duckett (2003). Além disso, do ponto de vista citogenético, há uma diferença quanto ao direcionamento da evolução cromossômica entre Disonychina e Oedionychina, uma vez que em Disonychina provavelmente ocorreu uma tendência para um incremento no número de cromossomos, enquanto Oedionychina teve um direcionamento quanto ao aumento no tamanho dos cromossomos sexuais (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI 1970, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

As espécies referentes ao segmento Oedionychina agruparam-se em um ramo único, com 100% de recuperação de valores de *bootstrap*. A tribo Oedionychini é um dos ramos dentro dos Coleoptera que em geral apresenta algumas características diferenciais, sobretudo os pertencentes aos Oedionychina, como ausência de sinapse nos cromossomos sexuais nas meioses de machos, tamanho aumentado de espermatócitos, redução no número de células por espermatócitos, cromossomos sexuais gigantes e assinápticos (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI, 1988). Sendo que a orientação e segregação desses cromossomos sexuais gigantes têm importantes implicações filogenéticas e evolutivas (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI 1970, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

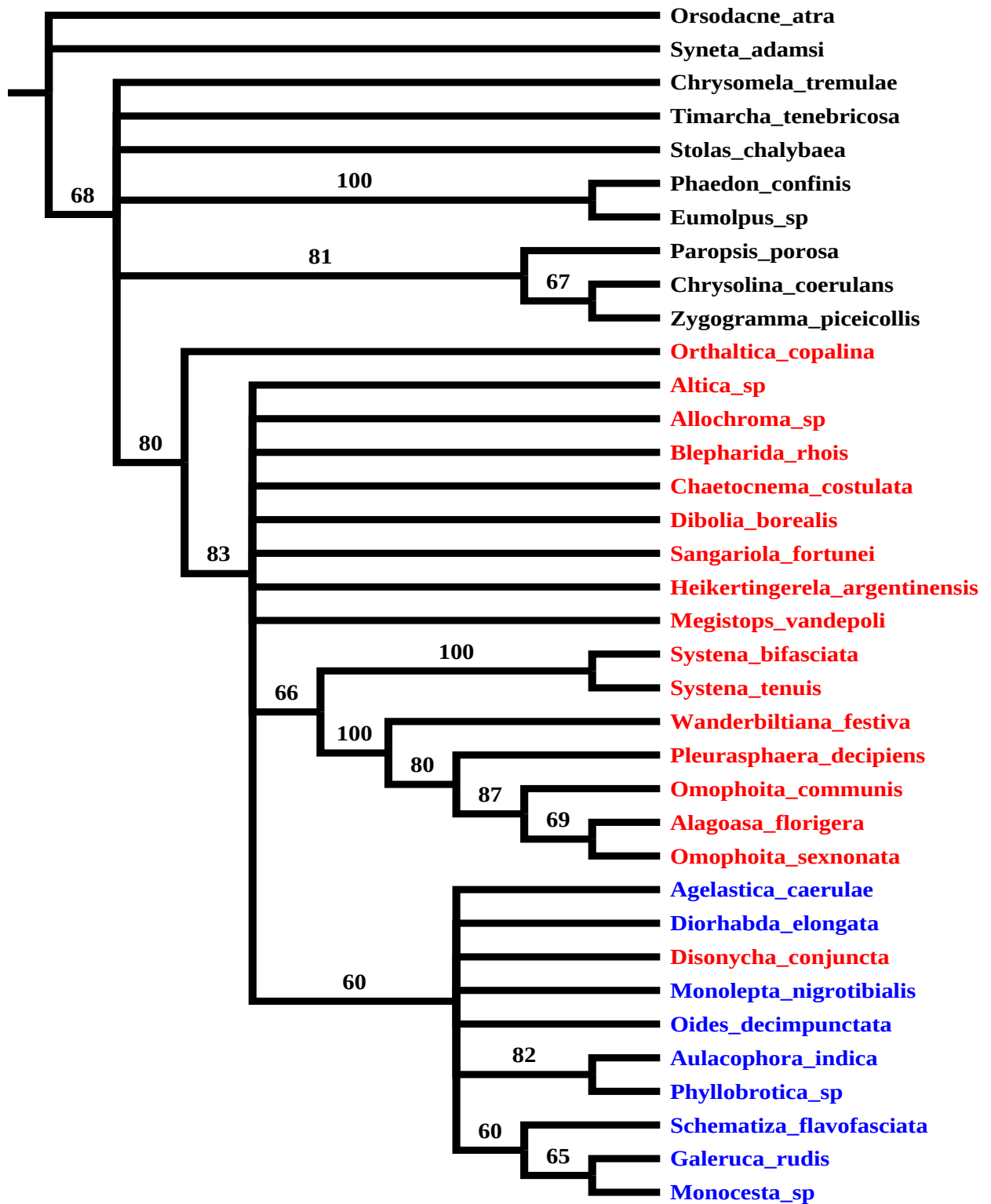


**Figura 1** - Filogenia molecular para Galerucinae *sensu lato* com base no alinhamento do 28S-D2 rDNA. Espécies em azul são referentes à Galerucinae *sensu stricto*, espécies em vermelhos referentes à Alticinae, e espécies em preto referentes aos grupos-externos. Números ao lado dos ramos representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações.

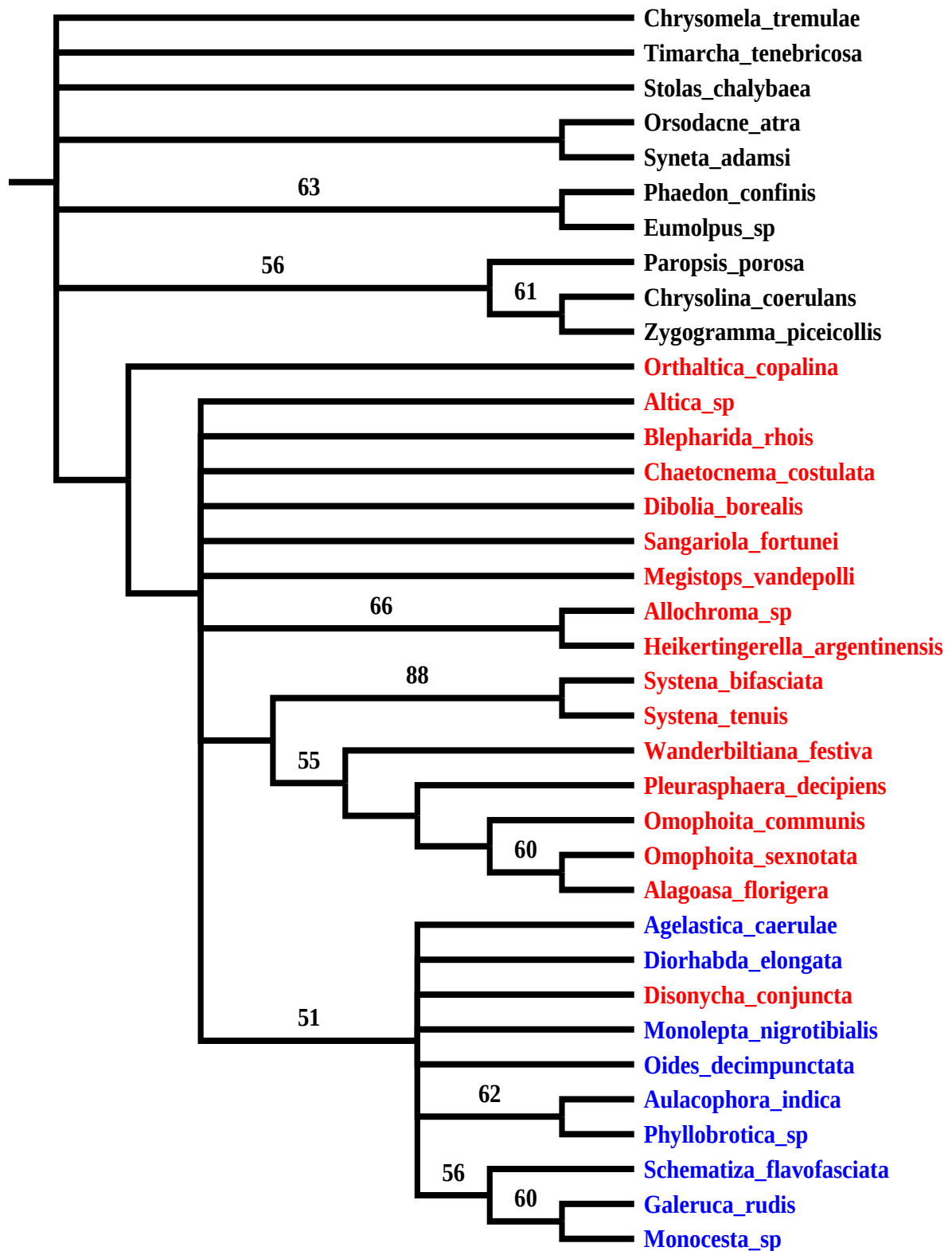


**Figura 2** - Análise combinada do grupo de dados moleculares, incluindo o 28S-D2 rDNA e o gene COI. Espécies em vermelho são referentes à Alticinae, espécies em azul à Galerucinae, espécies em preto aos grupos-externos. Números no topo dos nós representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações.

**Tabela 3** - Número médio de comprimento (pb), a média de bases para cada sequência (porcentagem) e o número de caracteres informativos para parcimônia.

| Gene        | A (%) | T (%) | C (%) | G (%) | Comprimento | Informativos para parcimônia |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------|------------------------------|
| 28S-D2 rDNA | 20    | 27    | 26    | 27    | 448 pb      | 234                          |
| COI         | 30    | 36    | 19    | 15    | 462 pb      | 275                          |

Segundo Virkki (1970), o alticíneo mais basal e mais próximo do ponto de quebra entre alticíneos e galerucíneos é o gênero *Forsterita*, a partir deste uma linha mais provável parece sugerir que a evolução dentro dos alticíneos foi polarizada para uma tendência a aumentar o tamanho dos espermatócitos e diminuir o número de células gaméticas por espermatocistos. Assim, a partir de *Forsterita* derivaram os primeiros alticíneos, e deles então os gêneros de *Altica*, sendo que *Oedionychina* supostamente é uma continuação dos *Altica*, e o grupo mais derivado dentro de Alticinae por apresentar as diferenças nos tamanhos e quantidade de espermatócitos já citadas.

*Heikertingerella* é um dos gêneros *incertae sedis* de Alticinae, um dos táxons considerados problemáticos, e por isso seu posicionamento filogenético não é conclusivo, sendo a elucidação de suas relações mais assertiva em análises contendo um número maior de táxons. *Heikertingerella* possui interessantes características citogenéticas, com espécies contendo 32 ou 64 espermatócitos por espermatocistos, sendo, portanto um táxon intermediário, além de possuir um sistema sexual considerado mais derivado (neo XY) e redução no número diploide (VIRKKI, 1970).

A análise dos resultados obtidos com o gene 28S-D2 apresentou maior eficácia para elucidação das relações filogenéticas (Figura 1) em comparação com os resultados obtidos com o gene COI, que quando analisado isoladamente, não obteve níveis significativos de resolução, mas quando aliado à análise do 28S-D2 mostra-se útil para a resolução das relações mais apicais (Figura 2).

A resolução da filogenia dos alticíneos, com a recuperação de sua monofilia, poderia ser resolvida com poucos passos adicionais, o que desta forma seria congruente com proposições anteriores, como de Farrell (1998), onde ambos os grupos foram recuperados como reciprocamente monofiléticos. Lingafelter e Konstantinov (1999), também assumiram a

monofilia de Alticinae, porém propondo que alticíneos formam um grupo monofilético dentro de Galerucinae, subordinado a este último e categorizados taxonomicamente como uma tribo (Alticini).

Na topologia, verifica-se uma tendência à formação de um agrupamento contendo espécies com distribuição neotropical e outro clado com distribuição neártica e paleártica, evidenciando uma provável limitação por condições climáticas, ambientais, e geológicas.

*Chaectocnema*, embora ocorrente na América do Sul, é considerado como um táxon com distribuição neártica que alcançou a América do Sul posteriormente, a partir da ligação ocorrida entre as Américas no pós-Plioceno, cerca de 70 m.a. (SCHERER, 1988).

A maior diversidade de alticíneos, quanto a espécies e gêneros, encontra-se na região Neotropical, sendo que quase a totalidade dos gêneros que ocorrem na América do Sul é endêmica, à exceção de *Chaectocnema*, *Epitrix*, *Longitarsus* e *Terpnochlorus* (SCHERER, 1988).

Essa diferença entre a fauna neártica e paleártica da neotropical e também a extrema diversidade, bem adaptada e “única” da América do Sul, suporta a teoria de que a porção do continente sul-americano ficou isolada há cerca de 100 m.a. do restante das porções continentais do mundo, assim a fauna neotropical sofreu processos evolutivos independentes do restante da fauna global e somente há cerca de 70 m.a. o continente sul-americano foi reconectado à porção continental norte americana, possibilitando assim o intercâmbio entre espécies pela ligação terrestre existente (SCHERER, 1988).

Além disso, outro fator importante durante a evolução dos Alticinae (e Chrysomelidae em geral) foi a explosão no crescimento das Angiospermas (SCHERER, 1988) no Cretáceo, o que possibilitou a diversificação dos Chrysomelidae uma vez que se acredita que a filogenia desse grupo seja um espelho da filogenia das Angiospermas (FARRELL, 1998; FARRELL; SEQUEIRA, 2004; GÓMEZ-ZURITA et al., 2007; SCHERER, 1988). Assim a diversidade deste grupo é maior em regiões tropicais devido a maior diversidade de Angiospermas em florestas tropicais (FARRELL; ERWIN, 1988).

## Conclusão

Galerucinae *sensu lato* é um grupo bem reconhecido, com vários estudos comprovando sua monofilia. Dentro desta subfamília os alticíneos e galerucíneos são, da mesma forma, comprovadamente relacionados filogeneticamente, porém o seu posicionamento dentro de filogenias moleculares e morfológicas continua confuso, onde a

tendência de estudos recentes aponta para uma monofilia de Galerucinae *sensu stricto* acompanhada de uma parafilia de Alticinae.

Oedionychini é uma importante tribo dentro de Alticinae, uma vez que alguns representantes apresentam características peculiares, como por exemplo, as características citogenéticas revisadas por Virkki; Santiago-Blay e Clark (1991) que aliadas a características peculiares dos próprios Alticinae em geral tornam este grupo um potencial foco de estudo. A maior distribuição dos Alticinae, sobretudo de Oedionychina, ocorre na região Neotropical, principalmente na América do Sul e devido a este fato são de extrema importância estudos filogenéticos quanto a espécies desta região incorporados a outros trabalhos considerando a fauna de outras regiões biogeográficas.

A monofilia de Galerucinae *sensu lato* foi corroborada, com a inclusão de galerucíneos e alticíneos no grupo interno, porém a monofilia de Alticinae não foi suportada. Entretanto, a partir da análise das topologias, pode se observar que são necessários poucos passos filogenéticos para se recuperar uma monofilia de Alticinae e Galerucinae, suportando hipóteses anteriores como de Farrell (1998), entre outros.

O gene 28S-D2 apresentou maior eficácia para recuperar as relações mais terminais, enquanto o COI apresentou uma maior eficácia na recuperação da monofilia de Galerucinae *sensu lato* e na resolução das relações terminais.

## **Referências Bibliográficas**

As referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

## 4.2. Capítulo II

### **Análise filogenética consensual para Galerucinae *sensu lato* (Coleoptera: Chrysomelidae) contemplando dados morfológicos e moleculares**

#### **Resumo**

Galerucinae *sensu lato* contém mais de 13.000 espécies, e contém dois agrupamentos principais, um dos galerucíneos verdadeiros, comumente denominados Galerucinae *sensu stricto*, e um agrupamento dos alticíneos, ou Alticinae, que são estritamente relacionados aos demais galerucíneos, mas devido a algumas diferenças morfológicas e comportamentais são alocados em agrupamento distinto. No entanto, as relações mais basais entre alticíneos e galerucíneos não foram totalmente elucidadas, sendo que a falta de um consenso filogenético do grupo limita o conhecimento e prejudica inferências ecológicas, sistemáticas, evolutivas, biológicas e conservacionistas quanto ao grupo, já que este possui espécies que são importantes ecológica e economicamente. Diversas análises, tanto morfológicas quanto moleculares, vêm sendo propostas, porém estas revelam, no geral, três hipóteses conflitantes, sendo: (a) a monofilia recíproca entre galerucíneos e alticíneos; (b) uma monofilia de Galerucinae com Alticinae parafilética e (c) Alticinae monofilético dando origem a Galerucinae parafilético. A técnica de construção de super árvore é uma abordagem que prevê a construção de filogenias mais abrangentes e construídas com base em um maior número de caracteres independentes, sendo possível a junção de topologias menores e independentes em filogenias maiores, desde que os táxons terminais tenham certo grau de sobreposição. Assim o presente estudo teve o objetivo de construir uma super árvore filogenética para Galerucinae *sensu lato*. Foram considerados 190 gêneros descritos na literatura e a super árvore foi construída utilizando 20 filogenias inferidas para o grupo. Foram gerados 764 caracteres, a partir da sobreposição dos dados morfológicos e moleculares originais, e análise parcimoniosa foi realizada com a abordagem de *ratchet*. A topologia final aponta mais contundentemente para uma tendência à formação de um grupo Galerucinae monofilético com um grupo Alticinae parafilético.

**Palavras-chave:** Alticinae. Alticini. Evolução. Meta análise. Super árvore. Sistemática.

## Introdução

Galerucinae é uma das subfamílias mais diversas dentro de Chrysomelidae, e juntamente com o grupo relacionado, os Alticinae, formam um importante agrupamento dentro da família Chrysomelidae. Durante a história sistemática deste grupo diversos estudos filogenéticos foram propostos, mas, em suma, apontavam para hipóteses conflitantes quanto ao real relacionamento entre galerucíneos e alticíneos. Os primeiros estudos apontavam para uma relação de recíproca monofilia entre uma subfamília Alticinae e outra subfamília Galerucinae (NEWMAN, 1835; JACOBY, 1908; HEIKERTINGER, 1912), sendo que estudos filogenéticos posteriores, baseados em caracteres morfológicos, também apontaram para esta hipótese de monofilia recíproca, sendo os principais os de Furth e Suzuki (1994), Konstantinov e Vandenberg (1996). Assim como também filogenias construídas utilizando caracteres moleculares, como a proposta por Farrell (1998). Porém, outras investigações propuseram a categorização de Alticini, como sendo uma tribo dentro de um agrupamento monofilético de Galerucinae, com as principais investigações que corroboram esta hipótese pertencentes a Chapuis (1875), Böving e Craighead 1931, Reid (1995), e Crowson e Crowson (1996).

Análises de Lingafelter e Konstantinov (1999) evidenciaram que Alticini era monofilético, porém uma tribo subordinada a Galerucinae, mas estes estudos não devem ser conclusivos, uma vez que a amostragem não contemplou todos os grupos dentro de Alticinae.

Gillespie et al. (2003), utilizando o alinhamento de sequências de 28S e COI, propôs um agrupamento monofilético de Galerucinae, com um grupo subordinado de Alticini, sendo este parafilético. Da mesma forma, Kim; Kjer e Duckett (2003) utilizando caracteres moleculares, e uma reanálise dos caracteres morfológicos de Lingafelter e Konstantinov (1999) propuseram um agrupamento monofilético de Galerucinae com Alticinae sendo uma categoria parafilética em seu interior, e Duckett; Gillespie e Kjer (2004) analisando dados independentes, tanto moleculares de 18S (FARRELL, 1998) e morfológicos (REID, 1995) chegaram a mesma conclusão. Estes resultados já proposto anteriormente por Reid (1995) utilizando apenas informações morfológicas.

Galerucinae *sensu lato*, é um importante agrupamento dentro dos insetos, para os quais ainda não há um consenso filogenético, seja para as relações mais basais, ou seja, o relacionamento entre galerucíneos e alticíneos, ou em sua porção mais apical, as relações entre suas tribos, gêneros e espécies.

Galerucinae *sensu lato*, apresenta inúmeras espécies que tem importância ecológica,

evolutiva (FARRELL; MITTER, 1990; FARRELL; MITTER; FUTUYMA, 1992; FUTUYMA; MCCAFFERTY, 1990; METCALF, 1994; MITTER; FARRELL, 1991; PASTEELS; ROWELL-RAHIER, 1991; TALLAMY; MULLIN; FRAZIER, 1999; TALLAMY; GORSKI; BURZON, 2000), e econômica (GILLESPIE et al., 2008; METCALF, 1994; SPIKE; TOLLEFSON, 1991), sendo um dos grandes grupos dos insetos e o mais importante economicamente para o qual ainda não existe um consenso filogenético (KONSTANTINOV, 1998). Filogenias amplas, considerando grande parte dos táxons do grupo e construídas utilizando um amplo número de caracteres são importantes para inferir hipóteses quanto à biologia, conservação, ecologia, sistemática, e evolução.

A técnica de construção de super árvores (GORDON, 1986) é uma ferramenta que visa a construção de filogenias mais amplas e informativas, através da combinação da informação filogenética já existente (BININDA-EMONDS, 2004).

O objetivo do presente trabalho é propor uma filogenia para Galerucinae *sensu lato* utilizando as principais análises propostas até o momento, utilizando diferentes tipos de caracteres independentes, e considerando o maior número de táxons possíveis.

## Material e Métodos

Foram colecionadas 20 filogenias supraespecíficas e específicas inferidas para a subfamília Galerucinae, incluindo os grupos Galerucinae e Alticinae, com base em caracteres morfológicos e moleculares, cujas topologias representam hipóteses evolutivas do relacionamento filogenético entre os gêneros e consequentemente entre alticíneos e galerucíneos (Tabela 1).

Todos os táxons terminais (OTUs) relacionadas nas árvores-fonte foram inventariados e reunidos em um único *set* de OTUs resultando em 189 gêneros de galerucíneos e alticíneos e a categoria taxonômica Chrysomelinae adicionada como grupo externo para enraizar a árvore. O *set* de unidades taxonômicas terminais pode ser visualizado no Apêndice C.

A partir de uma relação de politomia entre todos os 190 táxons terminais as relações filogenéticas contidas nas hipóteses evolutivas de origem (i.e., as topologias) foram reproduzidas individualmente para cada uma das 20 árvores-fonte, e os táxons não considerados em determinadas topologias foram deixados em uma relação basal de politomia, o que não interfere na análise das relações dos demais táxons e evita assim um conflito e reduz o tempo computacional na análise de sobreposição das informações filogenéticas.

A Tabela 1 contém as árvores-fonte utilizadas como *inputs* para a construção da super

árvore, os estudos originais dos quais as topologias foram retiradas e os tipos de caracteres utilizados nas análises.

**Tabela 1** - Tabela contendo as árvores-fonte utilizadas como *input* na construção da super árvore para a subfamília Galerucinae *sensu lato*, o tipo dos caracteres utilizados nas análises e as referências.

| <b>Input</b> | <b>Caracter</b>         | <b>Referência</b>                  |
|--------------|-------------------------|------------------------------------|
| 1            | Molecular               | Farrell (1998)                     |
| 2            | Molecular reanalizado   | Farrell (1998)                     |
| 3            | Morfológico             | Lingafelter e Konstantinov (1999)  |
| 4            | Molecular               | Kim; Kjer e Duckett, (2003)        |
| 5            | Molecular               | Kim; Kjer e Duckett, (2003)        |
| 6            | Molecular               | Kim; Kjer e Duckett, (2003)        |
| 7            | Molecular               | Farrell e Sequeira (2004)          |
| 8            | Molecular               | Farrell e Sequeira (2004)          |
| 9            | Morfológico             | Farrell e Sequeira (2004)          |
| 10           | Morfológico + Molecular | Farrell e Sequeira (2004)          |
| 11           | Morfológico + Molecular | Farrell e Sequeira (2004)          |
| 12           | Molecular               | Gómez-Zurita et al. (2007)         |
| 13           | Molecular               | Gómez-Zurita; Hunt e Vogler (2008) |
| 14           | Molecular               | Gómez-Zurita; Hunt e Vogler (2008) |
| 15           | Molecular               | Gillespie et al. (2008)            |
| 16           | Molecular               | Gillespie et al. (2008)            |
| 17           | Molecular               | Gillespie et al. (2008)            |
| 18           | Molecular               | Ge et al. (2011, 2012)             |
| 19           | Molecular               | Ge et al. (2012)                   |
| 20           | Molecular               | Este estudo                        |

A sobreposição das topologias foi conduzida no software CLANN (CREEVEY; McINNERNEY, 2005), gerando uma matriz binária contendo as informações de sobreposição das topologias das árvores-fonte. Tal matriz foi analisada sob o critério da parcimônia no TNT 1.1. (GOLOBOFF; FARRIS; NIXON, 2003), com 1000 replicações, com algoritmo de busca de *branch swapping* no modo TBR, utilizando análise de *ratchet* (NIXON, 1999), com 50

interações.

## Resultados e Discussão

A sobreposição das topologias originou 764 caracteres, ou pseudocaracteres, considerando 189 gêneros, sendo a filogenia com maior número de gêneros considerados para *Galerucinae sensu lato*, e construída com a maior quantidade de dados até o presente momento.

A monofilia de *Galerucinae sensu lato* foi comprovada através da reunião dos gêneros de *Galerucinae sensu stricto* e *Alticinae*, com *Chrysomelinae* sendo o grupo externo e grupo-irmão do grupo interno.

Ainda em um nível de resolução mais basal a super árvore mostra uma tendência que aponta mais contundentemente para a hipótese em que *Galerucinae* forma um agrupamento monofilético, com *Alticinae* tendendo à parafilia (Figura 1). Estes achados corroboram as propostas de Reid (1995) e posteriormente por Kim; Kjer e Duckett (2003), Gillespie et al. (2003), Duckett; Gillespie e Kjer (2004).

As topologias utilizadas para a construção desta filogenia são sobrepostas, mas em muitas vezes em uma quantidade bem limitada de táxons, o que é decorrente da grande diversidade e da abrangente distribuição das espécies, que dificulta as amostragens. Este reduzido grau de sobreposição causa um ruído na análise, diminuindo a capacidade de resolução das relações terminais da árvore, porém pode ser útil para a resolução das relações mais basais.

Na topologia pode ser observada uma tendência à formação de grupos distintos, entre táxons tropicais e holoárticos (Figura 2). Esta tendência pode refletir possíveis influências ambientais e também biogeográficas e históricas na evolução do grupo.

A fauna de *Alticinae* extremamente diversa, bem adaptada e em sua maioria endêmica da América do Sul suporta a teoria de que a porção do continente sul-americano ficou isolada há cerca de 100 m.a. do restante das porções continentais, assim a fauna neotropical sofreu processos evolutivos independentes do restante da fauna global. Somente há cerca de 70 m.a. o continente sul-americano foi reconectado à porção continental norte americana, possibilitando o intercâmbio entre espécies pela ligação terrestre a partir daí existente (SCHERER, 1988).

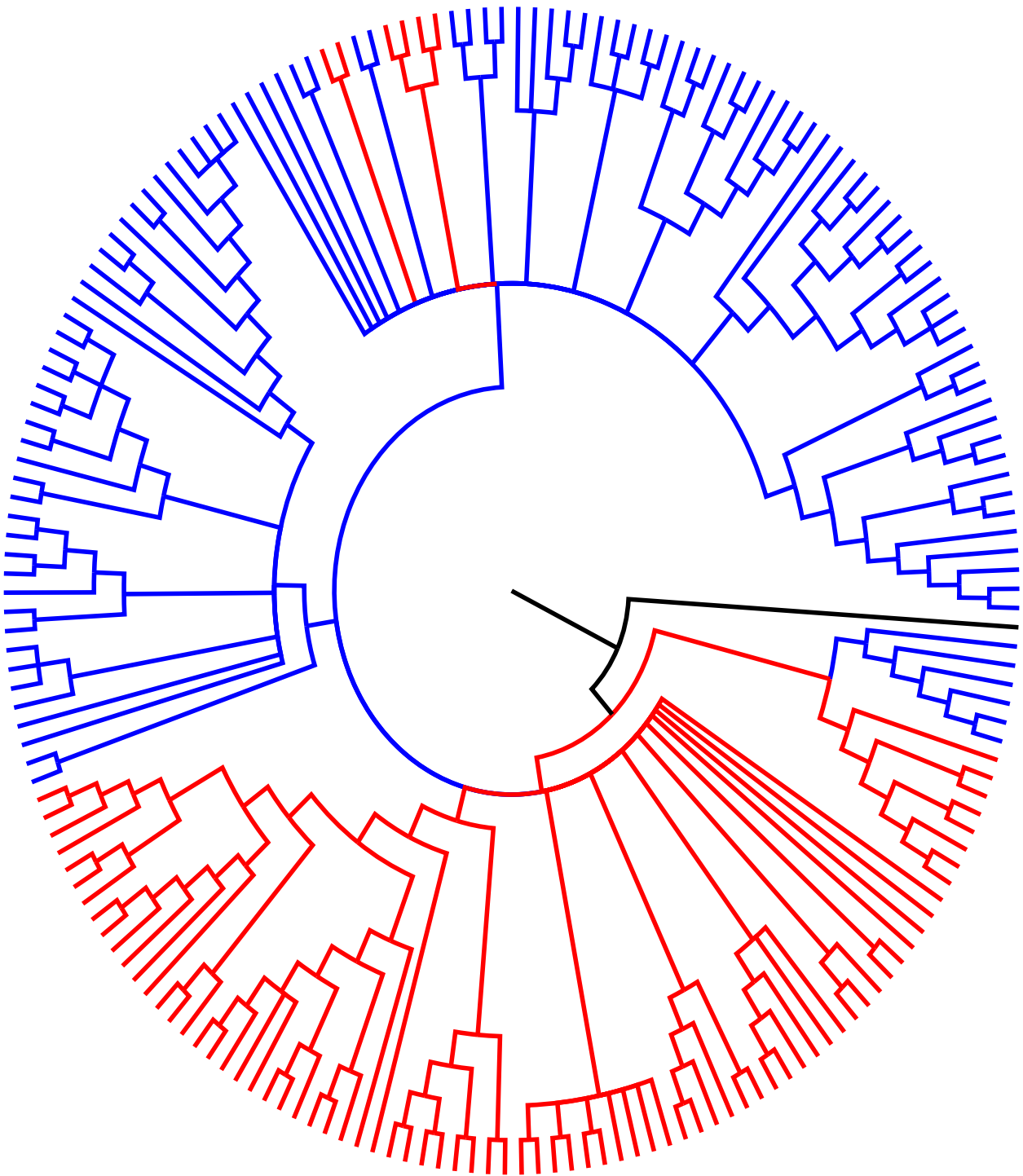


**Figura 1** - Visão geral da super árvore para Galerucinae *sensu lato*, com ênfase nas relações mais basais entre Galerucinae *sensu stricto* e Alticinae. Ramos em azul correspondem Galerucinae *sensu stricto* e ramos em vermelho à Alticinae.

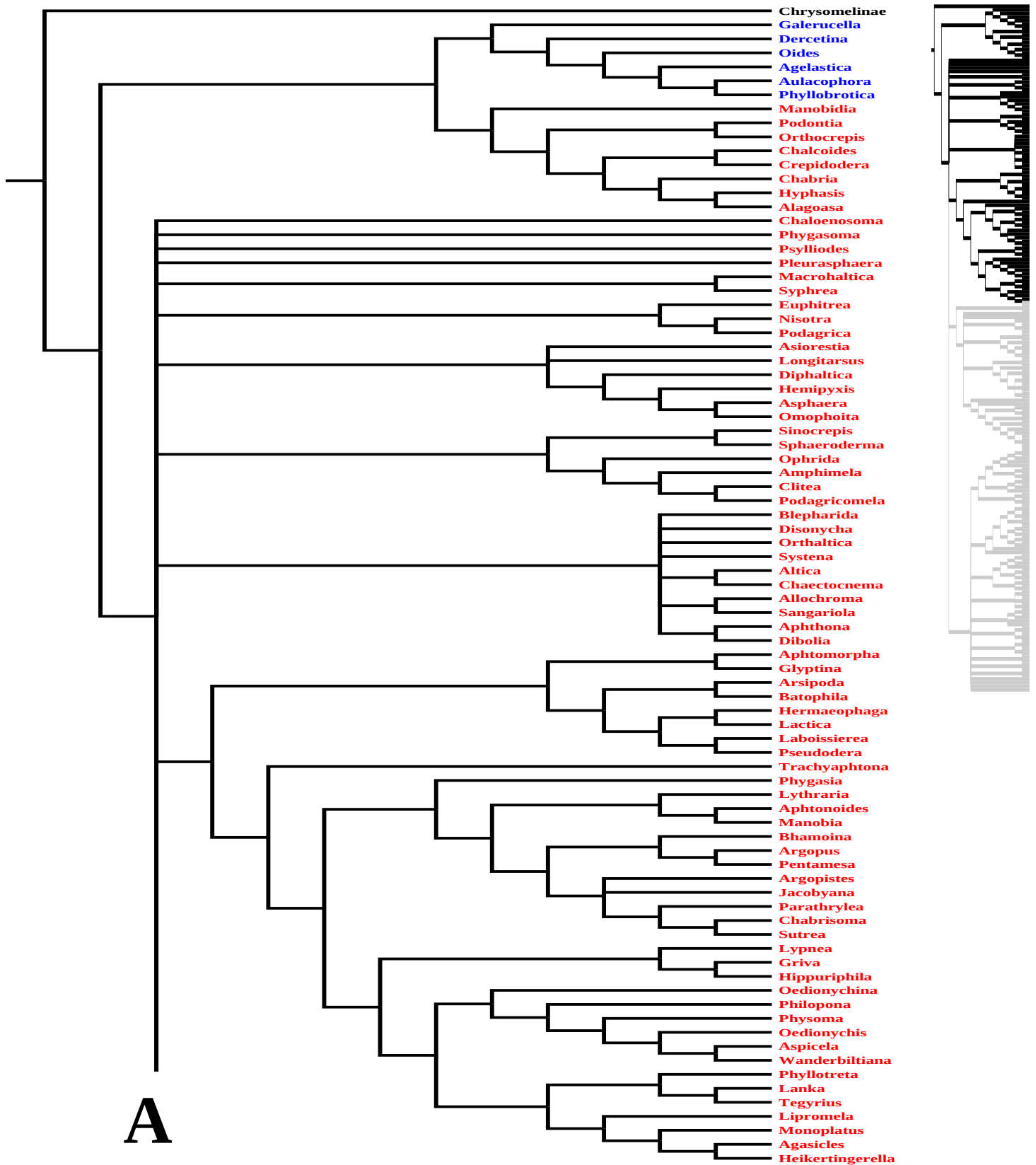


**Figura 2** - Super árvore filogenética construída para a subfamília Galerucinae *sensu lato* com base em dados morfológicos e moleculares utilizando Máxima Parcimônia, com 1000 replicações, utilizando *ratchet*. Gêneros em azul são referentes à Galerucinae *sensu stricto*, gêneros em vermelho referentes à Alticinae.

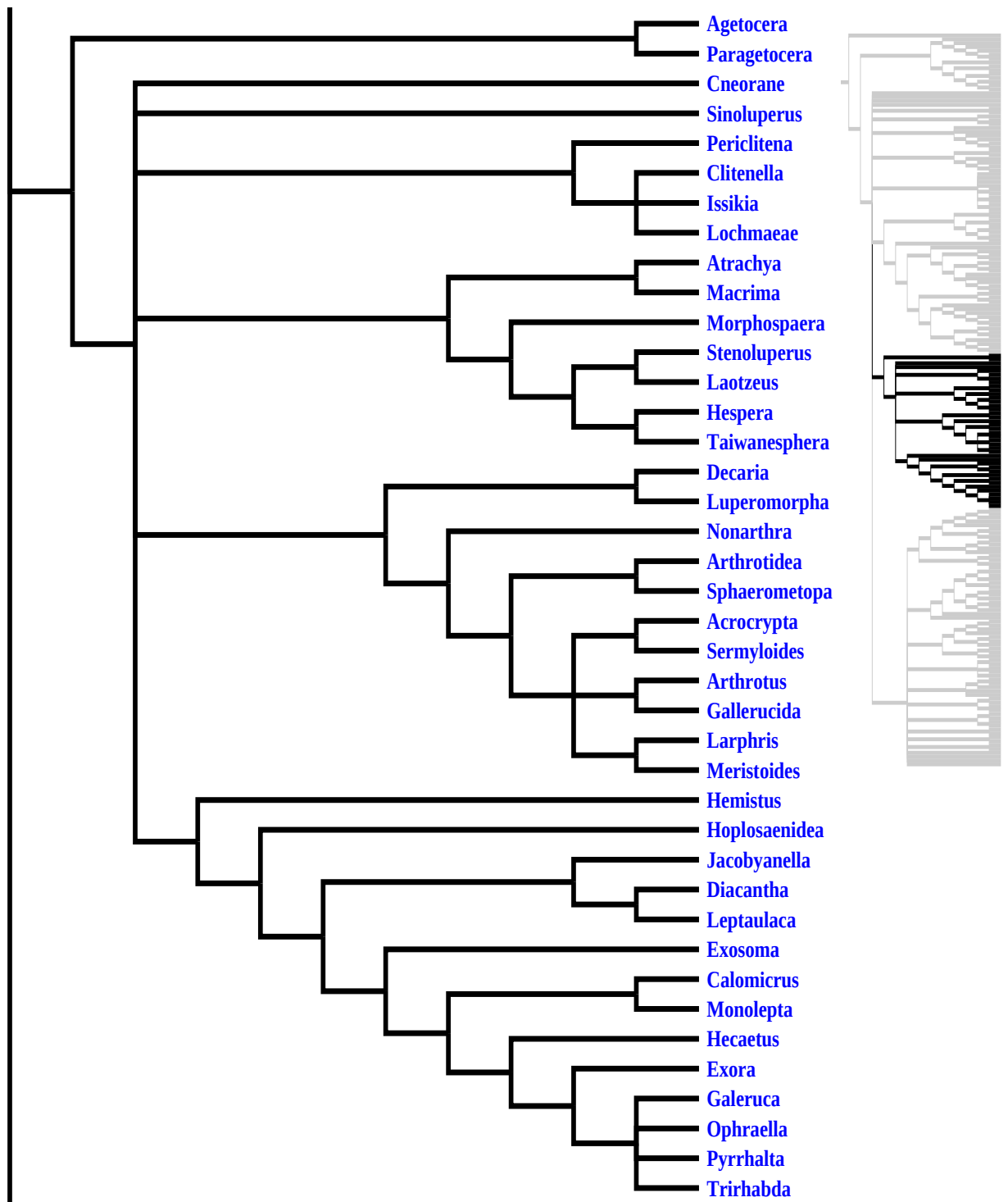
**A****B**

**Figura 2 - Continuação**

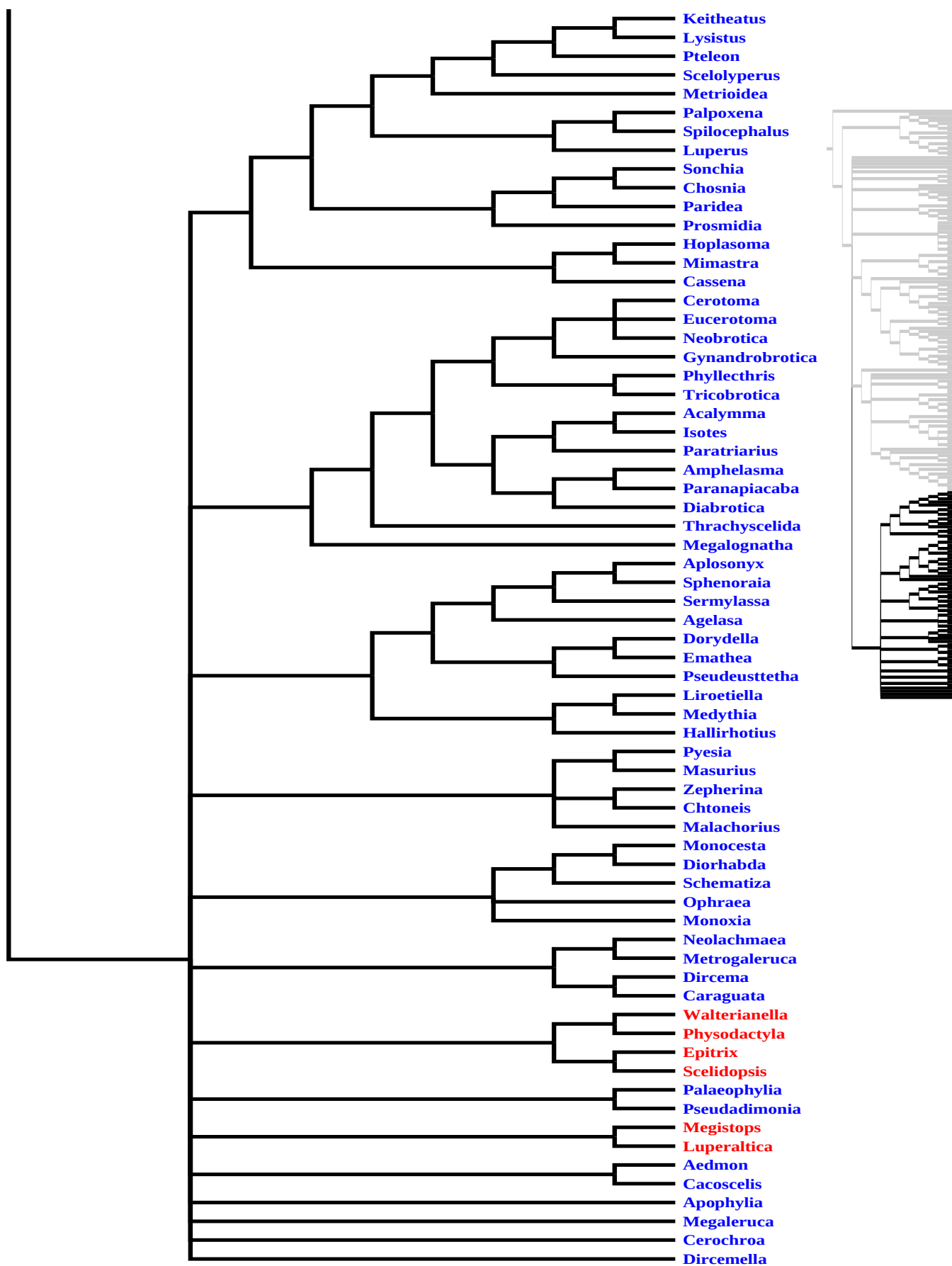


Figura 2 – Continuação

Outro evento importante na história do grupo foi a explosão no crescimento das Angiospermas (SCHERER, 1988) no Cretáceo, o que possibilitou a diversificação dos Chrysomelidae uma vez que se acredita que a filogenia desse grupo seja um espelho da filogenia das Angiospermas, logo a diversidade deste grupo é maior em regiões tropicais devido a maior diversidade de Angiospermas em florestas tropicais (FARRELL; ERWIN, 1988).

Do ponto de vista citogenético, para Virkki (1970), o ancestral que se encontra mais próximo do ponto de separação entre Galerucinae e Alticinae é o gênero *Forsterita*, e a partir deste uma série de modificações foi orientada para um aumento no tamanho dos espermátócitos e uma redução no número de células por espermátócitos, características estas presentes nos membros da tribo Oedionychini de Alticinae, principalmente nos Oedionychina, tornando-os supostamente os membros de Galerucinae *sensu lato* mais derivados.

É fato de que os caracteres morfológicos do grupo, sobretudo de Alticinae, possuem um alto grau de homoplasia o que prejudica a elucidação das relações do grupo (GE et al., 2012). O fêmur dilatado e a habilidade para o salto são características únicas dentro dos Chrysomelidae, que ocorre em poucos grupos, mas, sobretudo em Alticinae, essas características conferem uma vantagem adaptativa significativa contra predadores na história evolutiva do grupo, e vem sendo utilizado como caráter primário para diferenciação entre galerucíneos e alticíneos. Ge et al. (2011) discute a homoplasia do fêmur posterior dos Alticinae e sua implicação na filogenia do grupo. Os indícios apontam para uma hipótese onde o fêmur posterior dilatado e a capacidade de salto que ele confere possui múltiplas origens, e evoluiu a partir daí independentemente, convergindo durante a história filogenética, sendo portanto um caracter homoplásico (com múltiplas origens) e não homólogo (com um ancestral em comum), o que explica a grande confusão das classificações que se baseiam exclusivamente neste caracter para sua construção.

Uma evidência forte para a homoplasia do aparelho modificado para o salto em alticíneos é a presença de mecanismo semelhante, porém menos desenvolvido, em outras subfamílias de Chrysomelidae, e em outras famílias de Polyphaga como em Curculionidae e Buprestidae (GE et al., 2011).

Aliado a isso, a grande diversidade de Galerucinae *sensu lato* com mais de 13.000 espécies, a dificuldade de classificações, a existência de táxons “transicionais” ou “problemáticos” e a ampla distribuição pelo globo prejudicam amostragens que contemplem todas as categorias internas do grupo interno e fazem com que filogenias independentes sejam pouco sobrepostas, dificultando análises de evidência total.

Neste sentido, o presente trabalho, recupera uma topologia onde são necessários poucos passos filogenéticos para se recuperar a monofilia recíproca entre os dois grupos, o que seria congruente com análises anteriores como as de Farrell (1998). Análises de Lingafelter e Konstantinov (1999) também recuperaram a monofilia de Alticinae, porém em uma categoria subordinada à Galerucinae, propondo uma categorização em nível de tribo, ou seja, Alticini, o que não é suportado nesta análise.

## **Conclusão**

Super árvores oferecem ferramentas complementares para inferências evolutivas, sistemáticas, ecológicas, conservacionistas, biológicas, citogenéticas, entre outras.

Além disso, a metafilogenia serve como ponto de partida para análises de evidência total para Galerucinae *sensu lato*, que é um grupo com muitas divergências taxonômicas, com ampla diversidade e quantidade de espécies, além de uma ampla distribuição global, o que dificulta amostragens significativas dos principais agrupamentos no grupo interno, fazendo com que as análises possuam pouca ou quase nenhuma sobreposição, dificultando por sua vez a junção dos dados para análises mais globais. A construção de super árvore, sob essas condições de pouca sobreposição, apesar de ter sua capacidade de resolução diminuída em relações mais apicais, pode oferecer uma perspectiva das relações mais basais do grupo. Além disso, a técnica de Construção de Super Árvore é uma técnica de evidência total que possui a capacidade de reunir filogenias que são parcialmente sobrepostas, com alternativas para diminuir o ruído na análise proveniente da não congruência entre os táxons terminais e entre os caracteres utilizados.

A filogenia aqui apresentada, que considera a maior quantidade de gêneros para a subfamília, e construída com maior número de caracteres, também fornece uma ferramenta útil para escolha de táxons chaves para serem amostrados em futuros estudos filogenéticos mais específicos.

## **Referências Bibliográficas**

As Referências Bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

### 4.3. Capítulo III

#### **Super Árvore Filogenética de nível superior para Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) reunindo dados morfológicos e moleculares**

Siluriformes é a sexta maior ordem dos vertebrados, e a segunda maior dos peixes neotropicais, com cerca de 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3000 espécies. Possui ampla variação anatômica, fisiológica e comportamental. A monofilia da ordem é bem reconhecida através de inferências morfológicas e moleculares, porém apresenta inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos ao nível de famílias devido a grande diversidade encontrada no grupo, sendo a elucidação das relações filogenéticas das famílias de Siluriformes um grande desafio na sistemática de Peixes. O método de Super Árvore constitui uma abordagem capaz de gerar filogenias mais abrangentes e compreensivas através da combinação de dados filogenéticos pré-existentes. No presente estudo foram colecionadas 11 filogenias inferidas para a ordem Siluriformes, com base em dados morfológicos e moleculares, que foram combinadas e analisadas sob a perspectiva da parcimônia no PAUP\*, com 1000 replicações. A análise de confiabilidade de ramos se deu por *bootstrap* com 1000 replicações. Para a construção da super árvore, Gymnotiformes foi utilizado como grupo-externo. A super árvore recuperou relações de grupos bem reconhecidos na literatura como Sisoroidea, Loricarioidea, Doradoidea, Siluroidea e Bagroidea com altos valores de *bootstrap*. Diplomystidae é considerado o silurídeo mais ancestral, e como esperado se agrupou na base da árvore, sendo grupo-irmão do restante dos Eusiluroidei. A topologia final serve como uma importante ferramenta para diversas inferências, tanto biológicas, sistemáticas e evolutivas. Além disso, os resultados aqui suportados pela abordagem de construção de super árvore abrem uma grande perspectiva para a utilização dessa abordagem filogenética também em peixes.

**Palavras chave:** Bagres. Evolução. MRP. Sistemática. Taxonomia.

## Introdução

A ordem Siluriformes corresponde a sexta maior dentro dos vertebrados (LUNDBERG, 1975), e a segunda maior dentre os peixes neotropicais (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003) e possui aproximadamente 36 famílias, com 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (CUNHA, 2008; FERRARIS, 2007). As espécies de silurídeos ocorrem nas regiões Tropicais e Neotropicais, principalmente na América do Sul, Sul e Sudeste da Ásia e África (ARRATIA et al., 2003; BURGESS, 1989; DE PINNA, 1998; FERRARIS, 1998; TEUGELS, 1996; SOARES, 2008), implicando em uma provável limitação biogeográfica determinada pela temperatura (NELSON, 2006; SOARES, 2008). A maioria das espécies ocorre em ambientes de água doce, embora algumas famílias como Ariidae e Plotosidae tenham representantes em ambientes marinhos (BURGESS, 1989; DE PINNA, 1998). Além disso, as famílias Pimelodidae, Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae incluem espécies estuarinas, com certa tolerância a ambientes salinos (DE PINNA, 1998).

Siluriformes possui uma ampla variedade fisiológica, anatômica e comportamental, o que auxilia a ordem a ocupar uma ampla gama de diferentes nichos (SOARES, 2008). Os indivíduos possuem hábitos noturnos e/ou crepusculares, levando-os a explorar ambientes de águas turbas, como fundos de rios, espaços entre rochas e vegetação (FERRARIS, 1998, 1997, SOARES, 2008), e também ambientes debaixo da terra, aquíferos e espaços intersticiais (LUNDBERG; FRIEL, 2003).

Siluriformes não possuem escamas sobre o corpo, mas possuem barbilhões providos de papilas táteis e gustativas, usadas para a localização de comida e também para orientação e locomoção nos ambientes de fundo de rios (ALEXANDER, 1965; PAXTON; ESCHMEYER, 1998).

Os hábitos alimentares incluem espécies herbívoras, planctônicas, carnívoras e onívoras, com algumas espécies sendo hematófagas (KELLEY; ATZ, 1964; MACHADO; SAZIMA, 1983), e algumas lepidófagas, ou seja, que se alimentam de escamas (NELSON, 2006).

A monofilia de Siluriformes é bem suportada por complexos anatômicos sinapomórficos, sendo consensual entre vários autores recentes (ARRATIA, 1987, 1992, 2003; DE PINNA, 1993; FINK; FINK, 1981, 1996; MO, 1991). Sullivan; Lundberg e Hardman (2006) confirmaram a monofilia dos Siluriformes e também a monofilia da superfamília Loricarioidea através de dados moleculares, utilizando os genes RAG1 e RAG2.

Por outro lado o grupo possui diversos problemas sistemáticos e taxonômicos devido à ampla diversidade taxonômica da ordem, sendo a elucidação das relações filogenéticas dos Siluriformes, o maior desafio na sistemática de Peixes. (DE PINNA, 1998).

A classificação dentro das famílias de Siluriformes não é consensual entre os diversos autores, devido às variações no número e nome das famílias entre os autores, variando de 29 a 36 (BRITTO, 2003; ESCHMEYER, 1998; FERRARIS, 1998; FERRARIS, 2007; FERRARIS; DE PINNA, 1999; NELSON, 2006; TEUGELS, 1996).

A maioria dos estudos cladísticos em relação aos Siluriformes é dedicada às relações intrafamiliares (DIOGO, 2003), sendo poucos os estudos que verificam as relações entre os maiores grupos da ordem (BRITTO, 2003).

Os principais trabalhos filogenéticos com nível de resolução investigando as relações interfamiliares em Siluriformes podem ser atribuídos a Mo (1991), De Pinna (1993, 1998), Diogo (2004, 2008), Britto (2003) e Sullivan; Lundberg e Hardman (2006). Sendo a maioria desses estudos baseados em caracteres morfológicos e a investigação de Sullivan; Lundberg e Hardman (2006) baseada em caracteres moleculares referentes ao alinhamento dos genes nucleares RAG1 e RAG2.

O método de Construção de Super Árvore representa uma abordagem capaz de gerar filogenias mais amplas, compreensíveis e precisas através da combinação de informações filogenéticas já existentes (BININDA-EMONDS et al., 2004; SANDERSON; PURVIS; HENZE, 1998). Através da utilização de algoritmos formais, este método é baseado na sobreposição de árvores-fonte que foram inferidas através de grupos de dados independentes (GATESY et al., 2002). Utilizando dados já publicados ou incorporados a bancos de dados. Super árvores construídas com árvores-fonte compreensíveis e em número suficiente podem representar a informação provida com exatidão de origem (BININDA-EMONDS; SANDERSON, 2001; LEVASSEUR; LAPOINTE, 2003; PIAGGIO-TALICE et al., 2004).

No método de MRP (*Matrix Representation using Parsimony*) é construída uma única matriz binária representando a sobreposição das informações filogenéticas, ou seja, as hipóteses evolutivas, contidas nas árvores-fonte e essa matriz é analisada sob a perspectiva da parcimônia.

Neste sentido este trabalho pretende reunir as principais inferências com nível de resolução interfamiliar para a ordem Siluriformes, organizar as informações de modo passível de análise sob o método de Construção de Super Árvore, produzindo uma filogenia mais compreensível, informativa e ampla, contendo todas as famílias reconhecidas universalmente para a ordem.

## Material e Métodos

Foram colecionados na literatura, impressa e digital, 11 cladogramas retirados das principais análises filogenéticas a nível de família para a ordem Siluriformes. As hipóteses evolutivas de cada cladograma, (i.e., suas topologias) foram reproduzidas em software específico. Cada árvore utilizada como *input* é representada por uma sequência de números, parênteses e vírgulas que reproduz a topologia original em um formato de texto linear. Estas sequências foram organizadas em um único arquivo e executadas em software específico para construção da matriz de sobreposição das árvores de origem através do critério de MRP.

A matriz originária da sobreposição foi analisada a partir da perspectiva da parcimônia no PAUP\* (SWOFFORD, 2004), com 1000 replicações, busca heurística através de SPR (*sub-tree pruning and re-grafting*), início a partir de uma árvore de *neighbor-joining* e adição de sequência randômica. Os caracteres foram classificados como não ordenados e todos foram considerados com peso igual. A análise de confiabilidade de ramos se deu pelo teste de *bootstrap* não paramétrico (FELSENSTEIN, 1985).

As árvores de origem utilizadas na análise, o número respectivo de OTU's (*Operational Taxonomy Unities*), o tipo de dado, o método empregado nas análises originais e os trabalhos originais estão presentes na Tabela 1.

Bagridae apresentou uma natureza polifilética nas análises de De Pinna (1993, 1998), portanto na análise de construção desta super árvore a família foi dividida em Bagridae e Bagridae II, sendo que Bagridae II só foi relacionada nas hipóteses em que havia polifilia entre Bagridae.

Na matriz de sobreposição foram originados 258 caracteres, dos quais todos foram informativos para análise parcimoniosa, sendo todos analisados com peso igual, e de forma não ordenada. A análise gerou 65 árvores mais parcimoniosas, das quais foi obtido um consenso estrito.

**Tabela 1** - Contendo a identificação das árvores *inputs*, com o número de unidades taxonômicas (OTU's), o tipo de dado utilizado e o trabalho original das árvores-fonte utilizadas na construção da super árvore.

| <b>Input</b> | <b>Tipo de Dado</b>                                               | <b>Referência</b>                   |
|--------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>1</b>     | Morfológico                                                       | Mo (1991)                           |
| <b>2</b>     | Morfológico                                                       | De Pinna (1993)                     |
| <b>3</b>     | Morfológico                                                       | De Pinna (1998)                     |
| <b>4</b>     | Morfológico                                                       | Britto (2003)                       |
| <b>5</b>     | Morfológico                                                       | Diogo (2004)                        |
| <b>6</b>     | Morfológico (miológico)                                           | Diogo (2008)                        |
| <b>7</b>     | Molecular (RAG 1 e RAG 2)                                         | Sullivan; Lundberg e Hardman (2006) |
| <b>8</b>     | Molecular (DNA Nuclear)                                           | Lundberg e Sullivan (2007)          |
| <b>9</b>     | Molecular (cyt b, COI, 16S, RAG-1 e RAG-2)                        | Soares (2008)                       |
| <b>10</b>    | Molecular (RAG 1, RAG 2, cyt b, COI, ND4 plus, tRNA-His, tRNA-Ser | Sullivan (2008)                     |
| <b>11</b>    | Molecular (cyt b)                                                 | Hardman (2005)                      |

## Resultados e Discussão

Diplomystidae é considerado o silurídeo mais primitivo, ocorrendo apenas no extremo sul da América do Sul e é o único do grupo que possui o maxilar dentado (DE PINNA, 1998). Cetopsidae assume uma posição relativamente basal como previamente indicaram Mo (1991) e De Pinna (1998). Os resultados aqui obtidos corroboram a posição basal de Diplomystidae entre os Siluriformes e assume Cetopsidae como grupo externo adequado ao enraizamento da árvore obtida para a ordem Siluriformes (Figura 1).

Bagridae II, Rhamdidae, Parakysidae, Hypophthalmidae, Heteropneustidae e Helogeneidae possuem dados insuficientes na literatura e, portanto agrupam-se em um ramo polifilético na base da árvore devido à falta de resolução das relações filogenéticas nas árvores filogenéticas utilizadas como *inputs*.

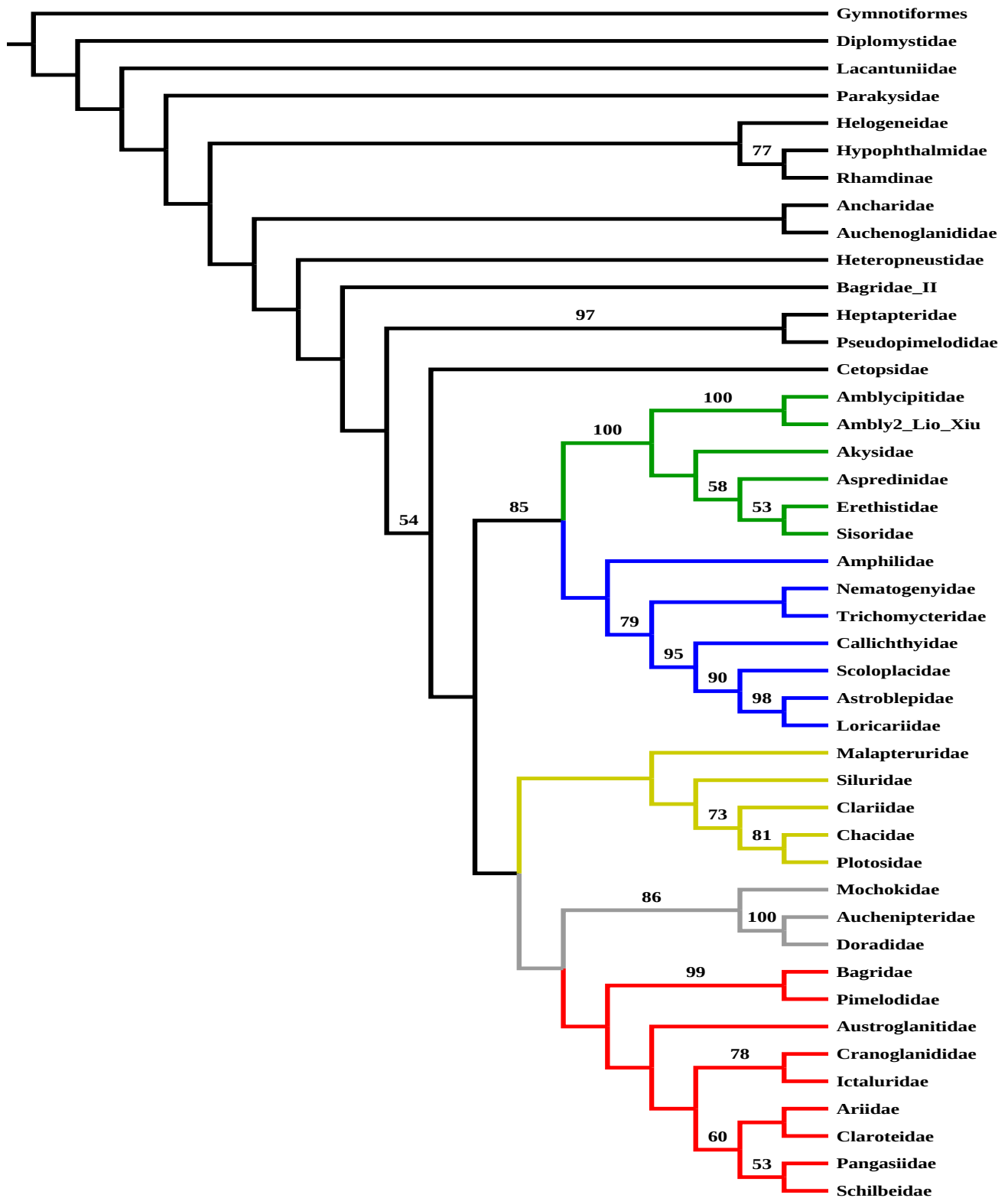


**Figura 1** - Super Árvore Filogenética para Siluriformes, utilizando Máxima Parcimônia. Números na base dos nós representam o valor de *bootstrap*. Esquema de cores dos ramos representam as superfamílias recuperadas, em verde Sisoroidea; em azul Loricarioidea; em amarelo Siluroidea; em cinza Doradoidea e em vermelho Bagroidea.

**Sisoroidea** – O Agrupamento das famílias Amblycipitidae, Akysidae, Aspredinidae, Erethistidae, Sisoridae e Amphilidae na super árvore com 100% de valores de bootstrap corrobora a formação da superfamília Sisoroidea.

**Loricarioidea** – A monofilia da superfamília Loricarioidea pode ser confirmado com o agrupamento das famílias Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae (*sensu stricto*), Amblycipitidae, Akysidae, Aspredinidae, Erethistidae, Sisoridae, Amphilidae, com 84% de valores de bootstrap. Dentro da superfamília Loricarioidea podemos observar a divergência entre um forte agrupamento entre Nematogenyidae e Trichomycteridae e o restante dos Loricarioidea, também denominados como Loricarioidea *sensu stricto* como inferido previamente por De Pinna (1998) e Britto (2003).

**Doradoidea** – Mochokidae, Auchenipteridae e Doradidae formam o agrupamento denominado Doradoidea (NELSON, 2006).

**Siluroidea** – Malapteruridae, Siluridae, Clariidae, Chacidae, Plotosidae, Ictaluridae, Cranoglanididae, Austroglanididae, Bagridae, Pimelodidae, Ariidae, Claroteidae, Pangasiidae e Schilbeidae formam o grupo denominado Siluroidea.

**Bagroidea** – Austroglanididae, Cranoglanididae, Austroglanididae, Bagridae, Pimelodidae, Ariidae, Claroteidae, Pangasiidae e Schilbeidae formam a superfamília Bagroidea.

A monofilia de Bagridae é um dos mais importantes problemas na Filogenia dos Siluriformes, uma vez que nenhum caráter considerado sinapomórfico que reúna todos os táxons considerados como pertencentes à família Bagridae é reconhecido. O estabelecimento do grupo taxonômico Bagridae foi primeiramente proposto por Reagan (1911) com apenas alguns caracteres (MO, 1991). A maior parte da família Bagridae agrupa-se nesta metafilogenia com a família Pimelodidae.

**Grupos não resolvidos** – Auchenoglanididae, Ancharidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae possuem dados incongruentes nas filogenias utilizadas como *inputs*, causando pouca resolução na sobreposição dos dados resultando em não resolução da relação filogenética destes táxons na super árvore.

De acordo com Rodiles-Hernandez et al. (2005) Lacantuniidae é considerada uma família da ordem Siluriformes, mas devido a recente descrição, este táxon foi pouco amostrado nas árvores-fonte, sendo necessários estudos específicos para o correto posicionamento desta família dentro do grupo.

## **Conclusão**

A técnica de Construção de Super Árvore mostrou-se eficiente para agrupar os dados filogenéticos existentes para a ordem dos Siluriformes, produzindo resultados congruentes para inferências evolutivas concretas.

A análise da super árvore mostra que alguns grupos necessitam de estudos mais específicos a fim de se estabelecer as relações com maior clareza, como por exemplo, entre alguns gêneros de Bagridae.

A topologia aqui apresentada serve como ferramenta para inferências evolutivas e sistemáticas posteriores, assim como também questões relacionadas à biologia, genética, citogenética, conservação e evolução em relação aos peixes Siluriformes. Além disso, a super árvore por oferecer uma perspectiva global do grupo e fornece um ponto de partida para escolha de táxons para estudos filogenéticos posteriores para investigações mais específicas.

## **Referências Bibliográficas**

As referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise filogenética molecular de Galerucinae recuperou a monofilia de Galerucinae *sensu lato*, com um grupo monofilético referente à Galerucinae *sensu stricto* e um grupo parafilético referente à Alticinae. A monofilia da tribo Oedionychini foi corroborada, sendo este um importante agrupamento dentro dos Alticinae, os quais possuem características peculiares citogenéticas como cromossomos sexuais gigantes e ausência de sinapse, além de apresentarem caracteres que os colocam como um dos grupos mais derivados dentro dos Alticinae como, por exemplo, o aumento no tamanho dos espermátócitos e redução no número de células gaméticas por célula.

A super árvore construída para Galerucinae *sensu lato*, da mesma forma recuperou sua monofilia, com tendência a formação no grupo interno de um grupo monofilético para Galerucinae *sensu stricto* e um agrupamento parafilético de Alticinae. Esta tendência a parafilia de Alticinae pode ser explicada pelo alto grau de homoplasia nos caracteres utilizados para os diferenciarem dos Galerucinae *sensu stricto*, sobretudo a homoplasia referente ao fêmur posterior dilatado, que se acredita que tenha múltiplas origens durante a história evolutiva do grupo, ocorrendo em outras subfamílias de Chrysomelidae, assim como em outras famílias de Polyphaga. Pode ser observado ainda que são necessários poucos passos filogenéticos para se recuperar a monofilia recíproca entre Alticinae e Galerucinae, o que seria congruente com análises anteriores como a de Farrell (1998).

Nas filogenias moleculares e na super árvore ocorre uma tendência a formação de agrupamentos distintos entre táxons com distribuição tropical daqueles da região neártica e paleártica. Essa tendência comprova a alta diversidade da fauna de Coleoptera, sobretudo de Alticinae da América do Sul, suportando ainda a hipótese de que a fauna neotropical ficou isolada do restante das porções continentais do globo, sofrendo processos evolutivos independentes (SCHERER, 1988). Além disso, acredita-se que a filogenia dos Coleoptera seja um espelho da filogenia das Angiospermas, assim a alta diversidade da fauna de Coleoptera das regiões tropicais, se deve a alta diversidade das Angiospermas contidas em florestas tropicais (FARRELL; ERWIN, 1988).

A construção da super árvore de Galerucinae *sensu lato*, devido a grande diversidade deste grupo, as dificuldades de classificação e também quanto à ampla distribuição geográfica foi baseada em *inputs* com *sets* de táxons parcialmente sobrepostos o que diminuiu a capacidade de resolução final do método, principalmente quanto às relações mais apicais, mas reteve uma satisfatória resolução em nível mais basal.

A análise consensual para a ordem Siluriformes foi baseada em *inputs* com maior grau de sobreposição o que foi responsável por uma maior resolução tanto basal quanto apical das relações filogenéticas da ordem. A topologia da super árvore recuperou a monofilia dos Siluriformes, com Diplomystidae sendo o silurídeo mais basal e o grupo-irmão do restante dos Eusiluroidei, além disso, recuperou também a monofilia de superfamílias bem corroboradas na literatura, sendo elas Sisoroidea, Loricarioidea, Doradoidea, Siluroidea e Bagroidea. Devido ao fato de a construção da super árvore para Siluriformes ter sido baseada em filogenias com alto grau de sobreposição em relação aos táxons terminais, a topologia final apresentou um satisfatório grau de resolução e altos valores de suporte.

A técnica de construção de super árvore é uma abordagem que pode ser incrementada de acordo com a disponibilidade de dados a serem disponibilizados futuramente, que podem ser facilmente incorporados aos dados existentes até o momento, aumentando a confiabilidade, a abrangência e a resolução das topologias.

Com base na construção das super árvore tanto de Galerucinae *sensu lato* quanto de Siluriformes pode-se concluir que super árvores construídas com *inputs* com alto grau de sobreposição apresentam melhores resultados, inclusive nas relações mais apicais, enquanto super árvores construídas com *inputs* que possuem pouco grau de sobreposição apresentam menores índices de resolução apical, mas podem oferecer uma visualização de relações mais basais.

A decodificação das topologias em matrizes para a análise filogenética consensual apresenta resultados significativos e não difere de abordagens de reanálise a partir dos dados primários.

Através da técnica de super árvore, pode-se agrupar dados que não são congruentes e também sets de táxons que são fracamente sobrepostos, sendo uma vantagem deste método em relação a outros métodos de análise conjunta.

Análises holísticas considerando a maioria dos táxons reconhecidos para os grupos de estudo fornecem importantes ferramentas para inferências evolutivas, biológicas, genéticas, citogenéticas, sistemáticas, ecológicas, entre outros. Fornecem também uma base para amostragem de táxons para investigações mais específicas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R. M. Structure and function in catfish. **J. Zool.**, 148, p. 88-152. 1965.
- ALMEIDA, M. C.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; NOGAROTO, V.; MATIELLO, R. R.; VICARI, M. R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. **Micron**, 41, p. 729-734. 2010.
- ARNQVIST, G.; WOOSTER, D. Meta-analysis: synthesizing research findings in ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, 10, p. 236-240. 1995.
- ARRATIA, G., Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): morphology, taxonomy and phylogenetic implications. **Bonn. Zool. Monogr.**, 24, p. 1-120. 1987.
- ARRATIA, G. Development and variation of the suspensorium of primitive catfishes (Teleostei: Ostariophysi) and their phylogenetic relationships. **Bonn. Zool. Monograph**, 32, p. 1-160. 1992.
- ARRATIA, G.; KAPOOR, B. G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. **Catfishes**, Plymouth: Science Publishers, 2003, 844 p.
- BECERRA, J. X. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. **Science**, 276, p. 253-256. 1997.
- BECHYNÉ, J.; SPRINGVOLÁ DE BECHYNÉ, B. Evidenz der bisher bekannten *Phenrica*-Arten (Col. Phytophaga, Alticinae), **Entomol. Tidskr.**, 87, p. 142-170. 1966.
- BÖVING, A. G.; CRAIGHEAD, F. C. **An illustrated synopsis of the principal larval forms of the order Coleoptera**. Entomol. Am. (N.S.) 11(1) 1931. 351 p.
- BININDA-EMONDS, O. R. P. The Evolution of Supertrees. **Trends in Ecology and Evolution**, 19, p. 315-322. 2004.

BININDA-EMONDS O. R. P. Supertree construction in the genomic age. In: ZIMMER, E. A.; ROALSON, E. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data** Elsevier, 2005, 745-757.

BININDA-EMONDS, O. R. P.; GITTLEMAN, J. L.; PURVIS, A. Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, 74, p. 143–175. 1999.

BININDA-EMONDS, O. R. P.; SANDERSON, M. J. Assessment of the accuracy of matrix representation with parsimony supertree construction. **Syst. Biol.**, 50, p. 565–579. 2001.

BININDA-EMONDS, O. R. P.; GITTLEMAN, J. L.; STEEL, M. A. The (Super) Tree of Life: Procedures, Problems, and Prospects, **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, 33, p. 265–89. 2002.

BRITTO, M. R. **Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da super família Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi)**. 512 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 2003.

BRUTON, M. N. Alternative life-history strategies of Catfishes. **Aquatic Living Resource**, 9, p. 35-41. 1996.

BURGESS, W. E. **An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes**. T.F.H. Publications, Neptune, NJ. 1989.

CARDILLO, M.; BROMHAM, L. Body size and risk of extinction in Australian mammals. **Conserv. Biol.**, 15, p. 1435–1440. 2001.

CAVALCANTI, M. J. A Phylogenetic Supertree of the Hammerhead Sharks (Carcharhiniformes: Sphyrnidae). **Zoological Studies**, 46, p. 6–11. 2007.

CHAPUIS, F. **Famille des Phytophages** In: LACORDAIRE, T.; CHAPUIS, F. **Histoire naturelle des insectes. Genera des Coléoptères. Vol. 11**. Paris. 1875. 420 p. p 124-134.

CHEN, S. H. Attempt at a new classification of the leaf beetles. **Sinesia**, 11, (5-6), p. 451-481,

illus. 1940.

CRACRAFT, J.; BARKER, F. K.; BRAUN, M.; HARSHMAN, J.; DYKE, G. J.; FELSENTEIN, J.; STANLEY, S.; CIBOIS, A.; SCHIKLER, P.; BERESFORD, P.; GARCIA-MORENO, J.; SORESENSEN, M. D.; YURI, T.; MINDELL, D. Phylogenetic Relationship among modern birds (Neornithes). Toward an avian tree of life. In: CRACRAFT, J.; DONOGHUE, M.J. **Assembling the tree of life**. New York: Oxford University Press. 2004.

CREEVEY C. J.; McINERNEY, J. O. Clann: Investigating phylogenetic information through supertree analyses. **Bioinformatics**, 21 (3), p. 390-392. 2005.

CROWSON, R. A.; CROWSON, E. A. The phylogenetic relations of Galerucinae-Alticinae. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L. **Chrysomelidae Biology, vol. 1: The classification, Phylogeny and Genetics**. Amsterdam: SPB Publishing, 1996. p. 97-118.

CUNHA, J. M. F. L. **Biodiversidade e Sistemática Molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) – com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo**. 33 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DAUBIN, V.; GOUI, M.; PERRIÈRE, G. A. Bacterial molecular phylogeny using supertree approach. **Genome Inform.**, 12, 155–164. 2001.

DAUBIN, V.; GOUI, M.; PERRIÈRE, G. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of genes sharing a common history. **Genome Res.**, 12, 1080–1090. 2002.

DAVIES, T. J.; BARRACLOUGH, T. G.; CHASE, M. W.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; SAVOLAINEN, V. Darwin's abominable mystery: insights from a supertree of angiosperms. **Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.**, 101, p. 1904–1909. 2004.

DE PINNA, M. C. C. **Higher level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi)**. 1993. Tese (Doutorado) - The City University of New

York, New York. 1993.

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, Z. M. S. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 279-330.

DIOGO, R. Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. **Catfishes**. London: Science Publishers, 2003. p.353-384.

DIOGO, R. **Morphological evolution, aptations, homoplasies, constraints, and evolutionary trends: catfishes as a case study on general phylogeny and macroevolution**. Enfield: Science Publishers. 2004.

DUCKETT, C. N.; GILLESPIE, J. J.; KJER, K. M. Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the Galerucinae. In: JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; SCHIMITT, M. **New Developments in the Biology of Chrysomelidae**. SPB Academic Publishing, The Hague, 2004. p. 3–18.

EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18, p. 586–608. 1964.

ESCHMEYER, W. N. **Catalog of Fishes. Special publication:** No. 1 of the Center for Biodiversity Research and Information, California Academy of Sciences, Eschmeyer editor and primary author, 1998. 2095 p.

FARRELL, B. D.; ERWIN, T. L. Leaf Beetle community structure in an Amazonian rainforest canopy In: JOLIVET, P.; PETIPIERRE, E; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht: Kluwer Academic, pp. 73-90. 1988.

FARRELL, B. D. Inordinate Fondness explained: Why are there so many beetles? **Science**, 281, p. 555–559. 1998.

FARRELL, B. D.; MITTER, C. Phylogeny of host affiliation: have *Phyllobrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and the Lamiales diversified in parallel? **Evolution**, 44, p. 1389. 1990.

FARRELL, B. D.; MITTER, C.; FUTUYMA, D. J. Diversification at the insect-plant interface. **Bio-Science**, 42, p. 34-42. 1992.

FARRELL, B. D.; SEQUEIRA, A. S. Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. **Evolution**, 58, p. 1984–2001. 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution**, 39, p. 783-791. 1985.

FERRARIS, C. J. **Catfishes and knifefishes**. In: PAXTON, J. R.; ESCHMEYER, W. N. **Eyclopedia of fishes**. 2<sup>nd</sup>. ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 106-112.

FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418, p. 1-628. 2007.

FERRARIS, C. J.; DE PINNA, M. C. C. Higher-level names for catfishes (Actinopterygii: Ostariophysi: Siluriformes). **Proc. Calif. Acad. Sci.**, 51, p. 1-17. 1999.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zool. J. Linn. Soc. Lond.**, 72, p. 297-353. 1981.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: STIASSNY, M. L. J.; PARENTI, L. R.; JOHNSON, G. D. **Interrelationships of fishes**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 209-49.

FURTH, D. G.; SUZUKI, K. Character Correlation Studies of Problematic Genera of Alticinae in Relation to Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). In: FURTH D. G. **Proceedings of the Third International Symposium on the Chrysomelidae**, 1992, Beijing. **Anais**. Leiden: Backhuys, 1994. p. 116–135.

FUTUYMA, D. J.; McCAFFERT, S.S. Phylogeny and the evolution of host plant association in the leaf beetle genus *Ophraella* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Evolution**, 44 (8), p. 1885-1913. 1990.

GALTIER, N.; GOUY, M. Molecular phylogeny of Eubacteria: a new multiple tree analysis method applied to 15 sequence data sets questions the monophyly of Gram-positive bacteria. **Res. Microbiol.**, 145, p. 531–541. 1994.

GATESY, J.; MATHEE, C.; DeSALLE, R.; HAYASHI, C. Resolution of a supertree/supermatrix paradox. **Syst. Biol.**, 51, p 652–664. 2002.

GATESY, J.; BAKER, R. H.; HAYASHI, C. Inconsistencies in arguments for the supertree approach: supermatrices versus supertrees of Crocodylia. **Syst. Biol.**, 53(2), p. 342-355. 2004.

GE, D. Y.; CHESTERS, D.; GÓMEZ-ZURITA, J.; ZHANG, L. J., YANG, X. K., VOGLER, P. A. Anti-predator defence drives parallel morphological evolution in flea beetles. **Proc. Roy. Soc. B**, 278 (1715), p. 2133–2141. 2011.

GE, D. Y.; CHESTERS, D.; GÓMEZ-ZURITA, J.; ZHANG, L. J., YANG, X. K., VOGLER, P. A. Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62, p. 793–805. 2012.

GILLESPIE, J. J.; KJER, K. M.; DUCKETT, C. N.; TALLAMY, D. W. Convergent evolution of cucurbitacin feeding in spatially isolated rootworm taxa (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae, Luperini). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 29, p. 161–175. 2003.

GILLESPIE, J. J.; TALLAMY, D. G.; RILEY, E. G.; COGNATO, A. I. Molecular Phylogeny of rootworms and related galerucine beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Zoologica Scripta**, 37 (2), p. 195-222. 2008.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. T.N.T.: Tree analysis Using New Technology. Program and documentation available at: [www.zmuc.dk/public/phylogeny](http://www.zmuc.dk/public/phylogeny). 2013.

GÓMEZ-ZURITA, J.; HUNT, T.; KOPILIKU, F.; VOGLER, A. P. Recalibrated Tree of Leaf

Beetles (Chrysomelidae) Indicates Independent Diversification of Angiosperms and Their Insect Herbivores. **PLoS One**, 2 (4) e360, p. 1–8. 2007.

GÓMEZ-ZURITA, J.; HUNT, T.; VOGLER, A. P. Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). **Cladistics**, 24, p. 34–50. 2008.

GORDON, A. D. Consensus supertrees: the synthesis of rooted trees containing overlapping sets of labeled leaves. **J. Classif.**, 3, p. 31–39. 1986.

GRESSIT, J. L. Plant-beetles from south and west China. I. Sagrinae, Donaciinae, Orsodacninae and Megalopodinae (Coleoptera). **Lingnan Sci. Journ.**, 20 (2-4), p. 271. 1942.

GRIFFITHS, C. S.; BARROWCLOUGH, G. F.; GROTH, J. G.; MERTZ, L. Phylogeny of the Falconidae (Aves): a comparison of the efficacy of morphological, mitochondrial, and nuclear data. **Mol. Phyl. Evol.**, 32, p. 101-109. 2004.

GROVE, S. J.; STORK, N. E. An inordinate fondness for beetles. **Invertebrate Taxonomy**, 14, p. 733-739. 2000.

HALL, T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, p. 95-98. 1999.

HAMMOND, P. M. Species inventory. In: GROOMBRIDGE, B. **Global Diversity, Status of the Earth's Living Resources**. London: Chapman and Hall, p. 17-39. 1992.

HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid cat fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Mol. Phylogenet. Evol.**, 37, p. 700–720. 2005.

HEIKERTINGER, F. Unterfamilie: Halticinae. In: REITTER, E. **Fauna Germanica, Die Käfer des Deutschen Reiches**, Vol. 4, pp. 143–212, Stuttgart, Germany: W. Junk. 1912.

HILLIS, D. M. Approaches for assessing phylogenetic accuracy. **Syst. Biol.**, 44, p. 3–16. 1995.

HILLIS, D.; MORITZ, C. Molecular systematics: context and controversies. In: HILLIS, D.; MORITZ, C.; MABLE, B. **Molecular Systematics**. 2nd Edition. Sunderland: Sinauer, 1987. p. 1-13.

JACOBY, M. **Coleoptera: Chrysomelidae**. vol. 1 in Bingham (Ed.): Fauna of British india including Ceylon and Burma, London. 1908. p 534.

JOLIVET, P. Recherche sur l'aile des Chrysomeloidea (Col.). Me'm. Inst. R. **Sci. Nat. Belg.**, 2, p. 1-180. 1959.

JOLIVET, P.; VERMA, K. K. **Biology of Leaf Beetles**. Andover: Intercept Publishers, 2002.

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MacLARNON, A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SIMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, 77, p. 223-259. 2002.

KELLEY, W. A.; ATZ, J. W. A pygidiid catfish that can suck blood from goldfish. **Copeia**, 4, p. 702-704. 1964.

KELLY, C. M.; BARKER, N. P.; VILLET, M. H. Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. **Syst. Biol.**, 52, p. 439-459. 2003.

KENNEDY, M.; PAGE, R.D.M. Seabird supertrees: combining partial estimates of procellariiform phylogeny. **Auk**, 119, p. 88-108. 2002.

KIM, S.J.; KJER, K.M.; DUCKETT, C.N. Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of galerucine/alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Syst. Evol.**, 34, p. 53-64. 2003.

KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H. G. Studies on polynucleotides. XCVI: repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. **J Mol Biol.**, 56(2), p. 341-361. 1971.

KONSTANTINOV, A. S. Comparative morphology and some evolutionary trends in flea beetles. In: JOLIVET, P. H.; COX, M.L., PETIPIERR, E. **Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. pp. 383–391.

KONSTANTINOV, A. S. **Revision of the Palearctic species of Aphthona Cheevrolat and a cladistic classification of the Aphthonini (Coleoptera: Chrysomelide: Alticinae)**. **Memoirs on Entomology, International**. Vol. 11. Florida: Associated Publishers Gainesville, 429 pp. 1998.

KONSTANTINOV, A. S.; VANDENBERG, N. J. **Handbook of Palearctic flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)**. *Contributions on Entomology, International*, 1, p. 237–439. 1996.

LATREILLE, P. A. **Histoire naturelle, générale et particulière, des crustacés et des insectes. Tome troisième. Familles naturelles des genres. xii + ‘An X’**. Paris. 1802. 468 pp.

LAWRENCE, J. F.; NEWTON, A. F. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names), In: PAKALUK, J.; SLIPINSKI, S. A. **Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera**. Warszawa: Muzeum i Institut Zoologii PAN, 1995. p. 779–1006.

LEVASSEUR, C.; LAPOINTE, F. J. Increasing phylogenetic accuracy with global congruence. In: JANOWITZ, M. F. **Bioconsensus** (Vol. 61). American Mathematical Society, 2003. p. 221–230

LINGAFELTER, S. W.; KONSTANTINOV, A. S. The monophyly and relative rank of alticine and galerucine leaf beetles: a cladistics analysis using adult morphological characters (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomol. Scand.**, 30, p. 397–416. 1999.

LIU, F. G. R.; MIYAMOTO, M. M.; FREIRE, N. P.; ONG, P. Q.; TENNANT, M. R.; YOUNG, T. S.; GUGEL, K. F. Molecular and morphological supertrees for eutherian (placental) mammals. **Science**, 291, p. 1786–1789. 2001.

LUNDBERG, J. G. Homologies of the upper shoulder girdle and temporal region bones in catfishes (order Siluriformes), with comments on the skull of the Helogeneidae. **Copeia**, 1, p. 66-74. 1975.

LUNDBERG, J. G.; FRIEL, J. P. Siluriformes. Catfishes. Version 20 January 2003 (under construction). <http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.2003

MACHADO, F. A.; SAZIMA, I. Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioicabertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). **Ciência e Cultura**, 35, p. 344- 348. 1983.

MAHON, A. S. A molecular supertree of the Artiodactyla. In: BININDA-EMONDS, O. R. P. **Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life (Vol. 3)**. Kluwer Academic, 2004. p. 411–437

METCALF, R. L. Chemical ecology of Diabroticits. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L.; PETIPIERRE, E. **Novel aspects of the biology of Chrysomelidae**. Boston: Kluwer Academic Publ., 1994. p. 153-169

MITTER, C.; FARRELL, B. D. Macroevoolutionary aspects of insect / plant relationships. In: BERNAYS, E. A. **Insect / Plant Interactions, Vol. 3**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 35–78.

MO, T. **Anatomy, Relationships and Systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) – With a Hypothesis of Siluroid Phylogeny**. Theses Zoologicae 17. Koeltz Scientific Books, Königstein. 1991.

MORAND, S.; MULLER-GRAF, C. D. M. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. **Parasitology**, 120, p. 45–56. 2000.

MULLIS, K. B.; FALOONA, E. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, 155, p. 335-350. 1987.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of High Molecular Weight Plant DNA. **Nucleic Acids Research**, 8, p. 4321-4326. 1980.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc. 1994.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4rd ed., New York: John Wiley & Sons Inc. 2006.

NEWMAN, E. Attempted division of British insects into natural orders. **Entomologists Magazine**, 2, p. 379–431. 1835.

NIXON, K. C. The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis. **Cladistics**, 14, p. 407-414. 1999.

PASTEELS, J. M.; ROWELL-RAHIER, M. Proximate and ultimate causes of host plant influence on chemical defense of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomologia generalis**, 15, p. 227-235. 1991.

PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W. N. **Encyclopedia of fishes**. 2a. ed. San Diego: Academic Press. 1998.

PETIPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J. S.; VIRKKI, N. Chromosome numbers and meioformulae of Chrysomelidae. In: JOLIVET, E.; PETIPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. Kluwer Academic Publishers, pp. 161–186. 1988.

PIAGGIO-TALICE, R.; BURLEIGH, G.; EULENSTEIN. Quartet supertrees. In: BININDA-EMONDS, O. R. P. **Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life (Vol. 3)**. Kluwer Academic, 2004. p. 173–191

PISANI, D.; YATES, A. M.; LANGER, M. C.; BENTON, M. J. (2002) A phylogenetic supertree of the Dinosauria, **Proceedings of the Royal Society of London**, 269, p. 915-921. 2002.

PLUNKETT, G. M. Relationship of the order Apiales to subclass Asteridae: a re-evaluation of

morphological characters based on insights from molecular data. **Edinb. J. Bot.**, 58, p. 183–200. 2001

PURVIS, A. A. composite estimate of primate phylogeny. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, 348, p. 405–421. 1995.

PURVIS, A.; WEBSTER, A. J. Phylogenetically independent comparisons and primate phylogeny. In: LEE, P. C. **Comparative Primate Socioecology**. Cambridge: University Press, 1999. p. 44–70

REAGAN, C. T. The Classification of the Teleostean Fishes of the Order Ostariophysi. 2. Siluroidea. **Ann. Mag. Nat. Hist.**, 8, p. 561. 1911.

REID, C. A. M. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae *sensu lato* (Chrysomeloidea). In: J. PAKALUL, S.; SLIPINSKI, A. **Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera**. Warszawa: Muzeum i Institut Zoologii PAN, 1995. p. 559–631.

REID, C. A. M. Spilophorynae Chapuis: a new subfamily in the Chrysomelidae and its systematic placement. **Invertebrate Taxonomy**, 14, p. 837–862. 2000.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729 pp. 2003

RILEY, E. G.; CLARK, S. M.; FLOWERS, R. W.; GILBERT, A. J. Chrysomelidae Latreille 1802. In: ARNETT, R. H.; THOMAS, M. C. **American Beetles**. CRC press. 2002. p. 617–691.

RODILES-HERNÁNDEZ, R.; HENDRICKSON, D. A.; LUNDBERG, J. G.; HUMPHRIES, J. M. *Lacantunia enigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. **Zootaxa**, 1000, p. 1–24. 2005.

SAMUELSON, G. A. An elytron to body meshing mechanism of possible significance in the higher classification of Chrysomelidae. In: FURTH, D. G. Proceedings of the Third International Symposium on the Chrysomelidae, 1992, Beijing. **Anais**. Leiden: Backhuys

Publishers, 1994. p. 136–147

SANDERSON, M. J.; PURVIS, A.; HENZE, C. Phylogenetic Supertrees: Assembling the trees of life. **TREE**, 13, p. 105-109. 1998.

SANDERSON, M. J.; DRISKELL, A. C.. The challenge of constructing large phylogenetic trees. **Trends in Plant Science**, 8, p. 374-379. 2003.

SCHERER, G. The Origins of the Alticinae In: JOLIVET, E.; PETIPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. Kluwer Academic Publishers, pp. 114–130. 1988.

SCHIMITT, M. The phylogenetic system of the chrysomelidae-History of ideas and present state of knowledge. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L. **Chrysomelidae Biology, vol. 1: The classification, Phylogeny and Genetics**. Amsterdam: SPB Publishing, 1996. p. 57-96.

SEENO, T. N.; WILCOX, J. A. Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomography**, 1, p. 1–221. 1982.

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: JOHN, B. **Animal Cytogenetic**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 366pp. 1978.

SOARES, A. A. **Estudos Filogenéticos na Superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base em sequências do DNA nuclear e mitocondrial**. 2008. 82 f.Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2008.

SPIKE, B. P.; TOLLEFSON, J. J. Yield Response of Corn Subjected to Western Corn Root Worm (Coleoptera: Chrysomelidae). Infestation and Lodging. **Journal of Economic Entomology**, 84, p. 1585-1590. 1991.

STONER, C. J.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; CARO, T. The adaptive significance of coloration in lagomorphs. **Biological Journal Linnean Society**, 79, p. 309–328. 2003.

SULLIVAN, J. P., LUNDBERG, J. G., HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major

groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 41, p. 636-662. 2006.

SULLIVAN, J. P. Molecular evidence for diphyly of the Asian catfish family Amblycipitidae (Teleostei: Siluriformes) and exclusion of the South America Aspredinidae from Sisoroidea. **Proc. of the Acad. of the Nat. Scien. of Phil.**, 175, p. 51-65. 2008.

SUZUKI, K. E FURTH, D. G. What is a Classification? A Case Study in Insect Systematics: Potential Confusion before Order. **Z. Scien.**, 9, p. 113-126. 1992.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDEL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, K. **Molecular Systematics**. 2ª edição. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514

SWOFFORD, D. L. PAUP\* – **Phylogenetic Analysis Using Parsimony\*and Other Methods, version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2004.

TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N., STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR. S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted). 2011.

TALLAMY, D. W.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. An alternative route to insect pharmacophagy: the loose receptor hypothesis. **J. Chem. Ecol.**, 25, p. 1987-1997. 1999.

TALLAMY, D.W.; GORSKI, P. M.; BURZON, J. K. Fate of male-derived cucurbitacins in spotted cucumber beetle females. **J. Chemical Ecology**, 26, p. 413-427. 2000.

TEUGELS, G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. **Aquat. Living Resour.**, 9, p. 9-34. 1996.

THOMAS, G. H.; WILLS, M. A.; SZÉKELY, T. A supertree approach to shorebird phylogeny. **BMC Evol. Biol.**, 4, p. 28. 2004.

VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticidae (Coleoptera). **Hereditas**, 64, p. 267–282. 1970.

VIRKKI, N. Cytotaxonomy of Alticinae. In: JOLIVET, E.; PETIPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1988. p 187-203.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; CLARK, S. M. Chromossomes of some Puerto Rican Disonychina and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini): Evolutionary implications. *Psyche*, 98, p. 374-390. 1991.

ZRZAVY, J.; RICAN, O. Morphological and molecular supertrees for metazoan phyla: conflict and accord in diverse comparative. **Cladistics**, 19, p. 162–163. 2003.

WHITE, R. E. Leaf beetles as biological control agents against injurious plants in North America. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L. **Chrysomelidae Biology, vol. 2: The classification, Phylogeny and Genetics**. Amsterdam: SPB Publishing, 1996. p. 373-399.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Agelastica caeruleae GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
CGTCGAA-GTCGAACGT-TCGTATGACGAACGACGT- ----  
Allochroma sp. GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGGC --  
TGTCGGA-GTTGGATGT-TCGTGTGACGGATGACGTT- ----  
Altica sp. ----- CCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTCTCGAC --  
TGTCGGA-GTTGAAAGT-TTGTGTGACGGATTACGTT- ----  
Aulacophora indica ----- AGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTCCCTTTTCGGC --  
TGTCGAC-GTTAAACGT-TTATACGACGGATGGCGT- ----  
Blepharida rhois ----- CCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCAGC --  
CGTTGGA-GTTGAACGT-TCGCGTGACGGACGACGTT- ----  
Chaetocnema costulata ----- CCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAC --  
CGTCGGA-GTTGGACGT-TCGAGTGACGGACGACGTT- ----  
Chrysolina coerulans GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
CGTTGGC-GATTGACGG-CTAGTGACGGATGGCGTT- ----  
Chrysomela tremulae GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGTC --  
TGCCGGC-GGTGACGG-GTGCGTGACGAACGGTGT- ----  
Dibolia borealis GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGGCT --  
CGTCGGA-GGAGAACGT-CGGCGTGACGGATGACGTT- ----  
Diorhabda elongata ----- AGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
AATTGAAGTTGAACCGT-TTGTATGACGGATATTGTTTGT- --  
Disonychia conjuncta ----- AAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
GATCGAAGGCTGGC-GT-GTTTATGACGGA-TCGTATAT- --  
Galeruca rudis GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
CGTTGAA-GTTGAATGT-TTGTATGACGGATGATGTG- --  
Monocesta sp. ----- GAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
CGTCGAAAGTTGAATGTATTTGTATGACGGATGACGTGTGTGC --  
Monolepta nigrotibialis GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGG --  
CGTCGAA-GTTAAGCGT-TTGTATGACGAAGATGT- --  
Oides decimpunctata GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
TGTTGAT-ATCGAGCAT-TAGTATGACGGTAAACGT- ----  
Orsodacne atra GGGTAAACCTNAGAAACCCNAAAGGTCGAATGGGGAAATTCATTTCRCGTTTCNAA --  
CRTSGGS-NCCGGGTyr-ACGNCGAGACGGGCGCCG-T- --  
Orthaltica copalina GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGGC --  
CGTCGGA-GTTGTGCGT-TCGTGTGACGGATGGCGCT- --  
Paropsis porosa GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAC --  
TGTCGGC-GATAAGTGA-TCTAGTGACGGATGGCGTT- --  
Phyllobrotica sp. ----- TGANAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGGC --  
TGTCGAA-GTTGAATGT-ATGTATGACGGATGGCGT- --  
Sangariola fortunei ----- CCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAC --  
TGTCGGA-GTTGGACGT-TCGAGTGACGGACGACGTT- --  
Schematiza flavofasciata ----- TGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
CGTCTAC-GTTAAATGT-TTGTATGACGGATGAGATACGTCG --  
Syneta adamsi ----- GAACTTACAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAC --  
CGTCGAT-GACGAGCGG-TCGAGTGACGGATGGCGTT- --  
Systema bifasciata --  
CCGACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGAGGAAATTCATTTCGCGTTTCGATTTTGTGCGGA-GTTGAGCGT-TTCGGCGACGAATGACGTT- --  
--  
Timarcha tenebricosa ----- AACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGAT --  
TGTCGGC-GATAAACGA-GCGAGTGACGGACGACGTACGT- --  
Zygogramma piceicollis GGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAAGGGGAAATTCATTTCGCGTTTCGGT --  
CGTCGGC-TATCGACGG-GCTAGTGACGGTGGCGTT- --  
Alagoasa florifera ----- CGC-ATCATTTCGCGGCTCGAT --  
ATCGGA-GTAGAATGA-TTATTGCGACGGATAGTAGAACT- --  
Eumolpus sp. ----- CCGATCATTTCGCGTTTCGGC --  
TGTCGGC-GTGGAGCGG-TTGGGGGACGGACGGGT- --  
Heikertingerela argentinensis ----- CTGATTGACCCCCCTTCCCC --  
GACGGG-CCAGGGGGCCTTGTGAACCCCCCCCCC --  
Megistops vandepoli ----- CCCGATTTCATTTCGCGTTTCGGTC --  
ATTGGA-GTTGGATGTATCAGCATGACGGTTGATACG- --  
Omophoita communis ----- CGAAATCATTTCGCGGCTCGAT --  
ATCGGA-GTAGAATGA-TTATTGCGACGGATGGTAGAACT- --  
Omophoita personata ----- CG-ATCATTTCGCGGCTCGAT --  
ATCGGA-GTAGAATGA-TTATTGCGACGGATAGTAGAACT- --  
Phaedon confinis ----- CGCATCAACGCCGTTTCCCC --  
GATTGGG-CTGAATGA-TTGTGTGACGACTAATGTA- --  
Pleurasphaera deciprens ----- CG-ATCATTTCGTTTCGAC --  
GTCGGA-GTAGAGCGA-TTATTGCGACGGATAGTAGAACT- --  
Stolas chalybae ----- GGGAAATCATTTCGCGTTTCGAT --  
TGTCGGC-GTTGAGCGG-TTGGGTGACTGACGGGGTA- --  
Systema tenuis -----

GGATTCAATTCGCGTTTCGATTTTGTCCGA-GTTGAGCGTTTCGGC--GACGAATGACGT-----  
Wanderbiltiana\_festiva\_-----CGG-ATC-TTCGCGTTTCGAC--  
ATCGGG-GTAGAATGA-TTATTGCGACGGATAGTGGAAC--

[illegible]

[illegible]

Systema\_tennuis\_ GTGCTCTGCTAAGACCCAGGAGGTCCACG --- -AAGCGTTT-  
TGCCTGCGTGAACCCCTGGTG -TATATCCGACAGACTCGCTCGACG  
Wanderbiltiana\_festiva\_ GTGTTTGCTCAAAGTCGGAGTGGTGCC - -GCGGGACATTTA -  
CACGTTCCGTGGACCTTCGATA -TTT - -CGACAACTCGCTCGACG

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|  
|....|

Agelastica caeruleae GTACGCTAATGGCGTGGGGCCGCTATCTT - - - - - T -  
TTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCGCGTTTTGTG - - TT  
Allochroma sp. GTATGCTAATGGCGCGGGGCCGCTACTC - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTGGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Altica sp. GTATGCTAAAGGCGCGGGGCCGCTACTC - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Aulacophora indica GTATACTAATGGCGCGAGGCCGCTATTTT - - - - -  
AATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTCTGCGT - - TT  
Blepharida rhois GTATGCTAATGGCGCGGGGCCGCTATT - - - - -  
CAGTTAGCGTTTCGGCCCGTAAACAGCACGTTCTGCGT - - TT  
Chaetocnema costulata GTATACGAATGGCGCGGGGCCGCTACACT - - - - -  
TAGTTAGCGTTTCGGGCCGTAGCAAGCACGTTCCGCGT - - TT  
Chrysolina coerulans GTATAATGATGGCGCGGGGCCGCTACT - - - - -  
TAGTTAGCGTTTCGGCTCGTGCGCAAGCGCGTTCCGCGT - - TT  
Chrysomela tremulae GTATAAGGAAGGCGCGAGGCCGCTACT - - - - -  
CAGTTAGCGTTTCGGCTCGCGGCAAGCGCGTTCCGCGT - - TT  
Dibolia borealis GTATGCTAATGGCGCGAGGCCGCTAT - - - - -  
CAATTAGCGTTTCGACCCGTAGCAAGCGCGTTCCGCGT - - TT  
Diorhabda elongata GTAGAAATATGGCGCGGGGCCGCTAGATT - - - - -  
AATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGAGCGTTTCTGTT - - TT  
Disonychia conjuncta GTATAACGATGGCGCAAGGCCGCTACATT - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCGCGTTCTGTGT - - TT  
Galeruca rudis GTATAAATATGGCGCGGGGCCGCTACAT - - - - -  
TAGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTTCCGCGT - - TT  
Monocesta sp. GTATAAATATGGCGCGGGGCCGCTACACATT - - - - - A -  
CAGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTTCTGTT - - TT  
Monolepta nigrotibialis GTATGCTAATGGCGTAAGGCCGCTACTTA - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCGCGTTCTGTGT - - T -  
Oides decimpunctata GTATATTGATGGCGCGGGGCCGCTACTTT - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Orsodacne atra GTAAGAATTAGGCGCGGGGCCGCTACCACT - - - - -  
CGGTTAGCGTCCGGCCCGCCGCAAGCACGTTCCGCGTTCCGG - - - - -  
Orthaltica copalina GTACATAGATGGCGTGGGGCCGCTACTC - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCGCGTTCTGTGT - - TT  
Paropsis porosa GTATAATGATGGCGCGGGGCCGCTACT - - - - -  
CAGTTAGCGTTTCGGCTCGTGCGCAAGCACGTTCCGCGT - - TT  
Phyllobrotica sp. GTATACTAATGGCGCGAGGCCGCTACTTA - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTCTGCGT - - TW  
Sangariola fortunei GTATGCTAATGGCGCGGGGCCGCTACTCT - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Schematiza flavofasciata GTATACATATGGCGCGGGGCCGCTACAC - - - - -  
AGTTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTTTCCGCGT - - TT  
Syneta adamsi GTATCATTAAAGGCGCGAGGCCGCTACTA - - - - -  
CAGTTAGCGTTTCGGCCCGCGGCAAGCACGTTCCGCGT - - TT  
Systema bifasciata GTATGCAATGGCGCGAGGCCGCTAAAC - - - - -  
AATTAGCGTTTCGGCTCGTAGCAAGCACGTTCCGTT - - TT  
Timarcha tenebricosa GTATAAAGATGGCGCGAGGCCGCTACTTCG - - - - - T - - - - - A -  
GAATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCGCGTTCTGTT - - TA  
Zygogramma piceicollis GTATAATGATGGCGCGGGGCCGCTACA - - - - -  
TAGTTAGCGTTTCGGCTCGTGCAAGCGGCAACGCGT - - TT  
Alagoasa florigera GTATACTATAGGCGCGAGGCCGCTATTGTTGTGCGTGTGAAATATCG - - -  
CGTACAACGTAATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTACCGTTT - - -  
Eumolpus sp. GATTAAACGATGGCGTGGGGCCGCTTCTACTCATCT - - - - - A -  
TACTTAGCGTTTCACCCGCGGTTGATGGTTCCGCAATTATC  
Heikertingerela argentinensis GTAAAGCTGAAGGCGCGGGGCCGCTTTTA - - - - -  
AATGAGCGTTTCGGCCCGTGGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Megistops vandepoli GTATGCTAATGGCGTGGGGCCGCTACTTT - - - - -  
AGTTAGCGTTCTGACCGTAGCAAGCACGTTCTGTGT - - TT  
Omophoita communis  
GTATACTAAAGGCGCGAGGCCGCTAGTGTGTGCGTGCGAAATATCGTCCGTCACACAGAATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTACCGT  
TT - - -  
Omophoita personata GTATACTAAAGGCGCGAGGCCGCTAGTGTGTGCGTGTGCGAAATATCG - - -  
CGTCAACAGAAATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTACCGTTT - - -  
Phaedon confinis ATATATCAATGGCGCAAGGCCGCTAATTTT - - - - -  
TAATTAGCGTTCAACACATGGCAAGCATATTTGTTGTT - - - T  
Pleurasphaera deciprens GTATACTAAAGGCGCGAGGCCGCTAGTGTGTGCGTGTGCGAAA - ATCG - -  
CGTCAACAGAAATTAGCGTTTCGGCCCGTAGCAAGCACGTACCGTTT - - -  
Pleurasphaera deciprens GTATACTAAAGGCGCGAGGCCGCTAGTGTGTGCGTGTGCGAAA - ATCG - -

Stolas\_chalybae GTATAAGATGGCGCGGGCCGCTAC-----A-----  
 CAGTTAGCGTTGGCCTACGGCAAGCACGTACGGTGT--TT  
 Systema\_tenuis GTATGCAAATGGCGGAGGCCGCTAAAC-----  
 AATTAGCGTTGGCCTCGTAGCAAGCACGTTCCGTGT--TT  
 Wanderbiltiana\_festiva GTATACTAAAGCGCGAGGCCGCTAATGTCGCGCGTGCGTAATATCG--  
 CGTGCGACGGAAATTAGCGTTGGCCCGTAGCAAGCACGTACCGTTTT--

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....  
 |....|

Agelastica caerulae GACGGTCAT CGGATCTAACGCCGATCTCGTCCCGAAACGACTGTTGGT-TACGGCGTT---  
 --CTCGAACAGACCTCATCGTTTCGATTTTTTCGAAAT  
 Allochroma sp. GACGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGC-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Altica sp. GACGGTGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGAACGACTGTTGGT-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Aulacophora indica GACGGCCAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGTT-----T  
 Blepharida rhois GACGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Chaetocnema costulata GACGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Chrysolina coerulea GACGGCGAT CGGACCTAGTGCCGATCTGTCCCGGGCGACTGTTGGC-TGCGATGTC---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Chrysomela tremulae -ACGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGC-CGCGATGCT---  
 --CTCGAACAGACCTCGAAT-----CT  
 Dibolia borealis GACGGCGAT CGGATCTGATGCCGATTCTGTCCCGAACGACTGTTGGT-  
 TACGGTGT---TCTCGAACAGACCTCG-----T  
 Diorhabda elongata GACGGTAAT CGGACATAATGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGTT-----T  
 Disonycha conjuncta GACGGCAATTCCGACCTAGCGCCGATTCCGTTCCAGAACGACTGTTGGT-TGCGGTGCT---  
 --CTCGAACAGACCTTGT-----  
 Galeruca rudis GACGGCGAT CGGACCTAGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGTT-----T  
 Monocesta sp. GACGGCGAT CGGACCTAGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-  
 TACGGTGT---TCTCGAACAGACCTCGTT-----T  
 Monoilepta nigrotibialis GACGGCCAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTTAT-----ATT  
 Oides decimpunctata GACAGTCAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGGAACGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGT-----TT  
 Orsodacne atra CACGGCGAT CGGACCCGGTGCCGGTCCCGTCCCGGGCGACTGTTGGC-GGCGGAGCT---  
 --CTCGAACAGACCTCC-----GT  
 Orthaltica copalina GATGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGAACGACTGTTGGC-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCT-----T  
 Paropsis porosa GACGGCGAT CGGACCTAGTGCCGATCTGTCCCGTACGACTGTTGGC-TGCGATGTT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Phyllobrotica sp. GATGGWCAT CGGACCTGGTGCCGATCTGTCCCGAACGACTGTTGGT-TACGGNGTT---  
 --CTCGAACAGACCTCNAT-----TA  
 Sangariola fortunei GACGGCGAT CGGACCTGGTGCCGATTCTGTCCCGAACGACTGTTGGC-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Schematiza flavofasciata GACGGCGAT CGGACCTAGTGCCGATTCTGTCCCGAACGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGAC-----T  
 Syneta adamsi GACGGAGAT CGGACCTAGTGCCGGTGCCGTCCCGAGCGACTGTTGGC-CGTGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----TC  
 Systema bifasciata GATGGTGAT CGGACCTAGTGCCGATTCTGTCCCGAATGACTGTTGGT-TGCGATGTT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Timarcha tenebricosa GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGGTCTGTCCCGAACGACTGTTGGC-TGCGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Zygogramma piceicollis GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGATCTGTCCCGTTCGACTGTTGGC-TGCGATGTT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Alagoasa florifera GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGATTCTGTCCGGGACGACTGTTGGTTTACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGT-----  
 Eumolpus sp. TACGATCAT CGCACCTGACGACTATTCTGTCTCGAATATTGTTGGC-TGAGGAGTT---  
 --AACGAACAACATCG-----TT  
 Heikertingerela argentinensis GACGGCGAT CGGAGTTTGTGCCGATTCTAGTCCCGAGCGACTGTTGGT-TACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCG-----T  
 Megistops vandepoli GATGGCAAT CGGACCTAGTGCCGATTCTGTCCCGAATGACTGTTGGT-TGCGGTTTTTA-  
 --TAGAACTGACCTCGT-----T  
 Omophoita communis GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGATTCTGTCCGGGACGACTGTTGGTTTACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGT-----T  
 Omophoita personata GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGATTCTGTCCGGGACGACTGTTGGTTTACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGT-----G  
 Phaeton confinis AATGGTAAT-TGGACCTAGTGCCGATTCTATTCCCAAGTGCGTGTTCG-TATGTTGT---  
 --CTTGAACGACCTCG-----T  
 Pleurasphaera deciprens GACGGCGAT CGGACCTAGCGCCGATTCTGTCCGGGACGACTGTTGGTTTACGGTGT---  
 --CTCGAACAGACCTCGT-----T



```

Stolas_chalybae          GAAACGCCGA-TCAA-----
Systema_tennuis_         GAAACGCCGA-
TCAAGCCATCAACATTTTGTGTTGCTACGAGCCGAACGCTAATTGTTTGCCTCCGCTTGTCTACCCAGGGGCGTCAATATTTAAGGA
Wanderbiltiana_festiva_  AAAACGCCGA-TCAA-----

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
|....|
Agelastica caerulae      -----
Allochroma sp.          -----
Altica sp                -----
Aulacophora indica      -----
Blepharida rhois        -----
Chaetocnema costulata   -----
Chrysolina coerulans    -----
Chrysomela tremulae     -----
Dibolia borealis        -----
Diorhabda elongata      -----
Disonycha conjuncta     -----
Galeruca rudis          -----
Monocesta sp            -----
Monolepta nigrotibialis -----
Oides decimpunctata     -----
Orsodacne atra          -----
Orthaltica copalina     -----
Paropsis porosa         -----
Phyllobrotica sp.       -----
Sangariola fortunei     -----
Schematiza flavofasciata -----
Syneta adamsi           -----
Systema bifasciata      -----
Timarcha tenebricosa    -----
Zygogramma piceicollis -----
Alagoasa florigera_     -----
Eumolpus sp.            -----
Heikertingerela_argentinensis -----
Megistops_vandepoli_    -----
Omophoita communis      -----
Omophoita personata_    -----
Phaedon_confinis_       -----
GCCAAAGGGTTAATAAAATCCCAACAACCCCTTAGAGACAAAGGTTTATAAAAATTTGGGAAACCTCTTTTAAAAGGCCCTCCCCCTTTCCAC
GTACC-
Pleurasphaera_deciprens -----

```

|                                                                                                          |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Stolas_chalybae                                                                                          | ----- |
| Systema_tennuis_                                                                                         | ----- |
| TTGATTAAATCTATTGGCGCTAAGACAGAGCACTATTAGGAAGAGTAGATCAAGGGAGGATGAGTGGGTTTTATGCTGTAAAAATTCTCACACAC          |       |
| CCAGCA                                                                                                   |       |
| Wanderbiltiana_festiva_                                                                                  | ----- |
|                                                                                                          | ----- |
| 710                                                                                                      | 720   |
| 730                                                                                                      | 740   |
| 750                                                                                                      | 760   |
| 770                                                                                                      | 780   |
| 790                                                                                                      | 800   |
| .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... |       |
| ....                                                                                                     |       |
| Agelastica caerulea                                                                                      | ----- |
| Allochroma sp.                                                                                           | ----- |
| Altica sp                                                                                                | ----- |
| Aulacophora indica                                                                                       | ----- |
| Blepharida rhois                                                                                         | ----- |
| Chaetocnema costulata                                                                                    | ----- |
| Chrysolina coerulans                                                                                     | ----- |
| Chrysomela tremulae                                                                                      | ----- |
| Dibolia borealis                                                                                         | ----- |
| Diorhabda elongata                                                                                       | ----- |
| Disonycha conjuncta                                                                                      | ----- |
| Galeruca rudis                                                                                           | ----- |
| Monocesta sp                                                                                             | ----- |
| Monolepta nigrotibialis                                                                                  | ----- |
| Oides decimpunctata                                                                                      | ----- |
| Orsodacne atra                                                                                           | ----- |
| Orthaltica copalina                                                                                      | ----- |
| Paropsis porosa                                                                                          | ----- |
| Phyllobrotica sp.                                                                                        | ----- |
| Sangariola fortunei                                                                                      | ----- |
| Schematiza flavofasciata                                                                                 | ----- |
| Syneta adamsi                                                                                            | ----- |
| Systema bifasciata                                                                                       | ----- |
| Timarcha tenebricosa                                                                                     | ----- |
| Zygogramma piceicollis                                                                                   | ----- |
| Alagoasa florigera_                                                                                      | ----- |
| Eumolpus sp.                                                                                             | ----- |
| Heikertingerela argentinensis                                                                            | ----- |
| Megistops vandepoli_                                                                                     | ----- |
| Omophoita communis                                                                                       | ----- |
| Omophoita personata_                                                                                     | ----- |
| Phaedon confinis_                                                                                        | ----- |
|                                                                                                          | ----- |



```

-----
Pleurasphaera_deciprens -----
-----
Stolas_chalybae -----
-----
Systema_tennuis_
AACCCCTGATGGAGTCCGTACGATCTGACGTGCAATCCATCGTCGGACTGGGTATAGGGGCGAAAATAAATCAACCCCATATGGTTCCCTCCGAAG
TTTCCT
Wanderbiltiana_festiva_ -----
-----

```

```

.....|
Agelastica caerulae -----
Allochroma sp. -----
Altica sp -----
Aulacophora indica -----
Blepharida rhois -----
Chaetocnema costulata -----
Chrysolina coerulans -----
Chrysomela tremulae -----
Dibolia borealis -----
Diorhabda elongata -----
Disonycha conjuncta -----
Galeruca rudis -----
Monocesta sp -----
Monolepta nigrotibialis -----
Oides decimpunctata -----
Orsodacne atra -----
Orthaltica copalina -----
Paropsis porosa -----
Phyllobrotica sp. -----
Sangariola fortunei -----
Schematiza flavofasciata -----
Syneta adamsi -----
Systema bifasciata -----
Timarcha tenebricosa -----
Zygogramma piceicollis -----
Alagoasa florigera_ -----
Eumolpus sp. -----
Heikertingerela_argentinensis -----
Megistops_vandepoli_ -----
Omophoita communis -----
Omophoita personata_ -----
Phaedon confinis_ -----
Pleurasphaera_deciprens -----
Stolas_chalybae -----
Systema_tennuis_ CCGGT
Wanderbiltiana_festiva_ -----

```

**APÊNDICE B** - Alinhamento das sequências do gene Citocromo Oxidase c Subunidade I (COI).

[illegible]

[illegible]

[illegible]



TCTCCTTTTATCAC-TTCCAGTTCTTGCAGGAGCAAT  
 Heikertingerela\_argentinensis  
 AAATCCCCAAATCTACGGAAGCTCCTCTATGAGCAATATTTGAGGATAGAGGGGGGTATACAGTTTCATCCAGTTCTACACCACTTTCAATTAA  
 TCTTCT  
 Alagoasa\_florigera\_ AGGA-ATAACTTTAGATCAAAATACCTTTATTTGTATGA-GCAGTAACAATTACTGCAATTTT-  
 ATTACTATTATCTT-TACCAAGTATTAGCAGGGGCTAT  
 Pleurasphaera\_decipiens\_ AGGA-ATGACCCTAGATCAAAATACCTTTATTTGTATGA-GCTGTTACAATTACTGCTATTTT-  
 ATTATTATTATCCT-TACCCGTATTAGCTGGAGCTAT  
 Systema\_tenuis\_ AGGA-ATACCTCTAGACCGTATGCCATTATTTGTATGA-GCAGTAGTAATTACAGCAATTTT-  
 ATTACTTTTATCCT-TACCTGTTCTGGCAGGTGCTAT  
 Phaedon\_confinis\_ AGAG-----AGAAAACCCCCCCCCTCTGTTTTGCCCCTTGTTGGTTTTTCTTCTTTT-  
 -TTTTTTTCTCCT-C-----  
 Megistops\_vandepoli\_ AGGC-ATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGA-TCTGTTATAATTACAGCAATTCT-  
 TCTTTTACTTTCT-TACCAAGTATTAGCAGGTGCCAT  
 Stolas\_chalybae  
 AGGGTGAAAAATTTGAATCCCCCCCCCGATTAGTTTGACGGAGCGGGGTTAAATGTTATTTTGAAAACTGCTCGGCC-  
 TACCCCGGCTCCTCTTTTTGGA

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500  
 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....  
 |....|  
 Agelastica caeruleae TAC-  
 AATACTATTAACGTACCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGACCCAACCGGTGGAGGTGACCCAATTCTATATCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Allochroma sp. AAC--GACTGTTGGCTACGGTGTCTCGAACAGACCTCGTTGAAACGCCGATCA-----  
 -----  
 Altica sp. TAC-  
 AATATTACTTTACAGATCGTAATTTAAATACATCTTTTTTTGAACCAAGCHGGVGGVGGDGYCCWATTTTATAYCAACAYTTATTYTGRITTYTY  
 GG  
 Aulacophora indica TAC-  
 AATATTATTAACAGATCGAAATCTAAATACCTTCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGAGGAGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Blepharida rhois CAC-  
 TATATTACTAACTGATCGAAATTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGVGGAGATCCAATTYTATACCAACATTTATTYTGATTTTTT  
 GG  
 Chaetocnema costulata TAC-  
 AATATTATTAACGTGATCGAAATCTCAATACCTTCATTCTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCAATTTTATATCAACACTTATTCTGATTTTTT  
 GG  
 Chrysolina coerulans TAC-  
 AATACTATTAACGTGATCGAAACTTTAAATACCTCTTTTTTTGATCCTACTAGTGGAGGTGACCCATTTCTTTACCAGCATCTATTCTGATTTTTT  
 GG  
 Chrysomela tremulae CAC-  
 AATACTTTTAACTGATCGAAATCTTAATACCTCTTTTTTTGACCCAGCAGGTGGGGGAGACCCAATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Dibolia borealis CAC-  
 AATATTATTAACAGATCGAAACTTTAAATACATCTTTTTTTGACCCCTCAGGAGGTGGAGATCCAATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Diorhabda elongata TAC-  
 TATACTATTAACGTGATCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGATCCTGCTGGGGGAGGAGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Disonycha conjuncta TAC-  
 TATATTATTAACGTGATCGTAATTTAAATACCTCTTTCTTTGACCCGTTGGAGGCGGTGACCCATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Galeruca rudis CAC-  
 TATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGACCCGGCCGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTCTT  
 GG  
 Monocesta sp. TAC-  
 TATACTTTTAACTGATCGAAACTTTAAACACCTCTTTTTTTGACCCCGCTGGAGGAGGTGATCCAATTCTGTATCAACATTTATTCTGATTTTTT  
 GG  
 Monolepta nigrotibialis TAC-  
 AATATTATTAACGTGATCGAAATTTAAACACATCTTTTTTTGACCCGTCAGGAGGGGGGATCCAATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Oides decimpunctata CAC-  
 TATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGACCCGTCAGGAGGTGGTGATCCAATCTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Omophoita sexnotata TAC-  
 AATACTACTTACTGATCGAAATTTAAATACCTCATTTTTTTGATCCMGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATCAACATCTATTTTGAT-----  
 --  
 Orsodacne atra TAC-  
 TATACTTCTAACAGATCGTAATATTAAATACATCTTTTTTTGACCCCTCTGGAGGGGGGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Orthaltica copalina TAC-  
 TATATTATTAACGTGATCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGATCCCGCCGGAGGAGGGGACCCAATTTCTCTATCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Paropsis porosa TAC-

TATGCTATTACAGACCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTATCCAGCAGATGGGGGAGACCCAATTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Phyllobrotica sp. TAC-  
 CATACCTTTAACTGATCGAACTTAAATACATCATTTTTTCGATCCTGCCGGGGAGGAGACCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTCTTT  
 GG  
 Sangariola fortunei TAC-  
 TATACCTATTAACTGACCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTATCCGGCAGGAGGAGGAGACCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Schematiza flavofasciata TAC-  
 TATGCTTTTAACTGACCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Syneta adamsi TAC-  
 TATATTATTACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTATCCAGCAGGAGGAGGTGACCCAATCTTATATCAACATTTATTTCTGATTTTTT  
 GG  
 Systema bifasciata TAC-  
 CATATTATTAACGACCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTGACCCGGCAGGCGGGGGAGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Timarcha tenebricosa TAC-  
 AATACCTTTTAACTGATCGAAATTTAAATACCTCTTTCTTTGATCCCTCAGGAGGTGGAGACCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Zygogramma piceicollis TAC-  
 AATATTATTACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTATCCTGTTAGAGGAGGTGACCCAATCTTTACCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Omophoita comunnis TAC-  
 TATACCTTTAACTGACCGAACTTAAACACCTCTTTTTTTGATCCGCTGGAGGAGGCGACCCAATCTTTACCAACACTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Wanderbiltiana festiva\_ TAC-  
 AATACCTATTACAGATCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCCGCAGGAGGAGGAGACCTATTCTATACCAACATCTATTCTGATTTTTT  
 GG  
 Phaedon confinis TAC-  
 TATATTACTAACTGATCGTAATATTAAATACGTCATTTTTTGACCCCTCAGGGGGAGGTGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Eulmolpus sp\_ TAC-  
 AATATTATTAACTGACCGAAATTTAAATACAACATTTTTTATCCGACAGGAGGAGGTGATCCTATTTTGATCAACACTTATTTTGATTCTTT  
 GG  
 Heikertingerela argentinensis  
 TATTAAGTAAAAATAAGAGGGAGGTAAAGTCAAATCTTATATTATTTATTCGAGGAAATGCTATATCAGGGGCCCAATTTATAGAGGA  
 ACTAAT  
 Alagoasa florigera\_ TAC-  
 AATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTCTTTTTTTGACCCGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAGCATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Pleurasphaera decipiens\_ TAC-  
 AATATTATTACAGATCGAAATTTAAATACATCCTTTTTTTGACCCCGCTGGAGGAGGAGACCCCATCCTCTATCAACACCTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Systema tennuis\_ TAC-  
 CATATTACTAACCGACCGAAATTTAAATACCTTCATTTTTTGACCCGGCAGGCGGGGGAGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTT  
 GG  
 Phaedon confinis\_ -----  
 -----  
 Megistops vandepoli\_ TAC-  
 CATATTACTAACTGATCGAAATTTAAATACAGATTTTTTATCCTTCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTCTGATTTTTT  
 GG  
 Stolas chalybae TAC-  
 ATCATAGGGGGGAGACGGGAAGGAAAAACAAGACTCTTATTCTCCGCCAAGGAGGAGTGCAAAACCAATCCGGGACAAAATGGATTCTGCC  
 GC

|                          | 510      | 520   | 530   |
|--------------------------|----------|-------|-------|
| Agelastica caerulea      | TCATCCT  | ----- | ----- |
| Allochroma sp.           | -----    | ----- | ----- |
| Altica sp.               | NCAYCCY  | ----- | ----- |
| Aulacophora indica       | GCATCCA  | ----- | ----- |
| Blepharida rhois         | ACACCCC  | ----- | ----- |
| Chaetocnema costulata    | ACATCCT  | ----- | ----- |
| Chrysolina coerulans     | GCACCCCT | ----- | ----- |
| Chrysomela tremulae      | CCACCCCT | ----- | ----- |
| Dibolia borealis         | ACATCCA  | ----- | ----- |
| Diorhabda elongata       | ACATCCT  | ----- | ----- |
| Disonychia conjuncta     | ACAYCCY  | ----- | ----- |
| Galeruca rudis           | ACATCCT  | ----- | ----- |
| Monocesta sp.            | TCATCCT  | ----- | ----- |
| Monoilepta nigrotibialis | ACATCCT  | ----- | ----- |
| Oides decimpunctata      | ACATCCT  | ----- | ----- |
| Omophoita sexnotata      | -----    | ----- | ----- |
| Orsodacne atra           | TCATCCT  | ----- | ----- |
| Orthaltica copalina      | TCACCCA  | ----- | ----- |
| Paropsis porosa          | GCAYCCY  | ----- | ----- |
| Phyllobrotica sp.        | ACATCCT  | ----- | ----- |

|                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| Sangariola fortunei           | ACATCCA-----                          |
| Schematiza flavofasciata      | ACACCCT-----                          |
| Syneta adamsi                 | ACATCCT-----                          |
| Systema bifasciata            | CCATCCA-----                          |
| Timarcha tenebricosa          | TCATCCY-----                          |
| Zygogramma piceicollis        | TCACCCT-----                          |
| Omophoita comunis             | ACACACAGAAGTTTATATTTTAAATTTACCAGGGG-- |
| Wanderbiltiana festiva_       | ACACCAGAAGTTTATATT-----               |
| Phaedon_confinis              | ACATCCAGAAGTTTATATTTAAATTTTACCAGGA--  |
| Eulmolpus_sp_                 | TCACCCTGAAGTTTATATTTAAATTTTAAACAGGG-- |
| Heikertingerela_argentinensis | CAATTACAATT-----                      |
| Alagoasa florigera_           | TCATCCTGAAGTTTATATTTAAATTTTACCAGGGGA  |
| Pleurasphaera_decipiens_      | ACATCCAGAAGTTTATATTAAAAATCTACCCGAGGA- |
| Systema tennuis_              | CCATCCAGAAGTTTATATTAAAAATTTTAAACGAGG- |
| Phaedon_confinis_             | -----                                 |
| Megistops vandepoli_          | TCACCCTGAAGTTTATATTAAATTTTAAACAGGGGA- |
| Stolas_chalybae               | ACAAAAA-----                          |

**APÊNDICE C** - Lista dos 190 gêneros utilizados no processo de construção de super árvore para *Galerucinae sensu lato*.

|    |               |
|----|---------------|
| 1  | Chrysomelinae |
| 2  | Agelastica    |
| 3  | Alagoasa      |
| 4  | Allochroma    |
| 5  | Altica        |
| 6  | Aphthona      |
| 7  | Asiolestia    |
| 8  | Asphaera      |
| 9  | Aulacophora   |
| 10 | Blepharida    |
| 11 | Calomicrus    |
| 12 | Chabria       |
| 13 | Chaetocnema   |
| 14 | Chaloesoma    |
| 15 | Chalcoides    |
| 16 | Crepidodera   |
| 17 | Dercetina     |
| 18 | Diabrotica    |
| 19 | Diacantha     |
| 20 | Dibolia       |
| 21 | Acrocrypta    |
| 22 | Diorhabda     |
| 23 | Diphaltica    |
| 24 | Disonycha     |
| 25 | Agasicles     |
| 26 | Euphitrea     |
| 27 | Exora         |
| 28 | Exosoma       |
| 29 | Galeruca      |
| 30 | Galerucella   |
| 31 | Hecetis       |
| 32 | Hemipyxis     |
| 33 | Hemistus      |
| 34 | Hoplosaenidea |
| 35 | Hyphasis      |
| 36 | Jacobyana     |
| 37 | Leptaulaca    |
| 38 | Longitarsus   |
| 39 | Luperus       |
| 40 | Macrohaltica  |
| 41 | Manobidia     |
| 42 | Monocesta     |
| 43 | Monolepta     |
| 44 | Nisotra       |
| 45 | Oides         |
| 46 | Omophoita     |
| 47 | Ophraella     |
| 48 | Orthaltica    |
| 49 | Orthocrepis   |
| 50 | Phygadeuon    |
| 51 | Phyllorhiza   |
| 52 | Podagricus    |
| 53 | Podontia      |
| 54 | Psylliodes    |
| 55 | Pyrrhalta     |
| 56 | Sangariola    |
| 57 | Schematiza    |
| 58 | Sphenorhiza   |
| 59 | Stenoluperus  |
| 60 | Syphrea       |
| 61 | Systema       |
| 62 | Triphabda     |
| 63 | Scelidopsis   |
| 64 | Cacoscelis    |
| 65 | Epitrix       |
| 66 | Physodactyla  |
| 67 | Walterianella |
| 68 | Luperaltica   |
| 69 | Aedmon        |
| 70 | Agetocera     |
| 71 | Amphimela     |
| 72 | Aphtomorpha   |
| 73 | Aphtonoides   |

|     |                  |
|-----|------------------|
| 74  | Caraguata        |
| 75  | Dircema          |
| 76  | Dircemella       |
| 77  | Cerochroa        |
| 78  | Megaleruca       |
| 79  | Metrogaleruca    |
| 80  | Monoxia          |
| 81  | Neolachmaea      |
| 82  | Ophraea          |
| 83  | Argopistes       |
| 84  | Pseudadimonia    |
| 85  | Apophyllia       |
| 86  | Chtoneis         |
| 87  | Masurius         |
| 88  | Malachorius      |
| 89  | Pyesia           |
| 90  | Zepherina        |
| 91  | Palaeophyllia    |
| 92  | Emathea          |
| 93  | Aplosonyx        |
| 94  | Sermylassa       |
| 95  | Agelasa          |
| 96  | Dorydella        |
| 97  | Paridea          |
| 98  | Chosnia          |
| 99  | Sonchia          |
| 100 | Prosmidia        |
| 101 | Isotes           |
| 102 | Paranapiacaba    |
| 103 | Acalymma         |
| 104 | Paratriarius     |
| 105 | Amphelasma       |
| 106 | Gynandrobrotica  |
| 107 | Neobrotica       |
| 108 | Eucerotoma       |
| 109 | Cerotoma         |
| 110 | Tricobrotica     |
| 111 | Phyllecthris     |
| 112 | Thrachyscelida   |
| 113 | Medythia         |
| 114 | Scelolyperus     |
| 115 | Lysistus         |
| 116 | Keitheatus       |
| 117 | Mimastra         |
| 118 | Hoplasoma        |
| 119 | Hallirhotius     |
| 120 | Pteleon          |
| 121 | Liroetiella      |
| 122 | Cassena          |
| 123 | Argopus          |
| 124 | Metrioidea       |
| 125 | Spilocephalus    |
| 126 | Palpoxena        |
| 127 | Megalognatha     |
| 128 | Pseudeusttetha   |
| 129 | Megistops        |
| 130 | Arsipoda         |
| 131 | Arthrotidea      |
| 132 | Arthrotus        |
| 133 | Aspicela         |
| 134 | Atrachya         |
| 135 | Batophila        |
| 136 | Bhamoina         |
| 137 | Chabrisoma       |
| 138 | Clitea           |
| 139 | Clitenella       |
| 140 | Cneorane         |
| 141 | Decaria          |
| 142 | Gallerucida      |
| 143 | Glyptina         |
| 144 | Griva            |
| 145 | Heikertingerella |
| 146 | Hermaphrodis     |
| 147 | Hespera          |
| 148 | Hippuriphila     |
| 149 | Issikia          |
| 150 | Jacobyana        |
| 151 | Laboissiereia    |

|     |                |
|-----|----------------|
| 152 | Lactica        |
| 153 | Lanka          |
| 154 | Laotzeus       |
| 155 | Larphris       |
| 156 | Lipromela      |
| 157 | Lochmaeae      |
| 158 | Luperomorpha   |
| 159 | Lypnea         |
| 160 | Lythraria      |
| 161 | Macrima        |
| 162 | Manobia        |
| 163 | Meristoides    |
| 164 | Monoplatus     |
| 165 | Morphospaera   |
| 166 | Nonarthra      |
| 167 | Oedionychina   |
| 168 | Oedionychis    |
| 169 | Ophrida        |
| 170 | Paragetocera   |
| 171 | Parathrylea    |
| 172 | Pentamesa      |
| 173 | Periclitena    |
| 174 | Philopona      |
| 175 | Phygasia       |
| 176 | Phyllotreta    |
| 177 | Physoma        |
| 178 | Podagricomela  |
| 179 | Pseudodera     |
| 180 | Sermyloides    |
| 181 | Sinocrepis     |
| 182 | Sinoluperus    |
| 183 | Sphaeroderma   |
| 184 | Sphaerometopa  |
| 185 | Sutrea         |
| 186 | Taiwanesphera  |
| 187 | Tegyrius       |
| 188 | Trachyaphtona  |
| 189 | Wanderbiltiana |
| 190 | Pleurasphaera  |