

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARINA MONJARDIM

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LEPTOPHLEBIIDAE (EPHEMEROPTERA)
NEOTROPICAL**

**VITÓRIA
2017**

MARINA MONJARDIM

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LEPTOPHLEBIIDAE (EPHEMEROPTERA)
NEOTROPICAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Roberta Paresque

Co-orientador: Frederico Falcão Salles

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Humanas e Naturais da
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Saulo de Jesus Peres – CRB-6 ES-000676/O

M744s Monjardim, Marina, 1991-
Sistemática molecular de Leptophlebiidae (Ephemeroptera)
Neotropical / Marina Monjardim. – 2017.
53 f. : il.

Orientador: Roberta Paresque.
Coorientador: Frederico Falcão Salles.
Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Efemérida. 2. Filogenia. 3. Zonas biológicas – Trópicos. I.
Paresque, Roberta, 1978-. II. Salles, Frederico Falcão. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

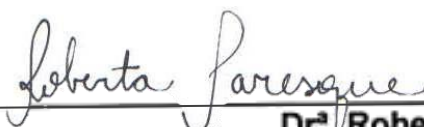
Marina Monjardim

**"Sistemática Molecular de Leptophlebiidae (Ephemeroptera)
Neotropical"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Animal.

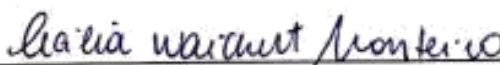
Aprovada em 23 de fevereiro de 2017.

Comissão Examinadora:

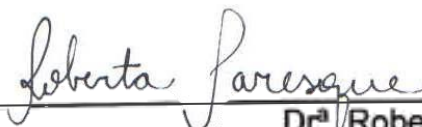


Dr^a Roberta Paresque (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão

Dr. Frederico Falcão Salles (UFES)
Coorientador



Dr^a Cecília Waichert Monteiro (UFES)
Examinadora Interna



Dr^a Roberta Paresque (UFES)
Por Dr. Eduardo Domínguez (Universidad Nacional de Tucumán)
Examinador Externo

Quem me dera se eu pudesse sentir por um instante com os sentidos que não os meus

Olhando com seus olhos, qual beleza eu veria?

Voando com suas asas quanta coragem eu teria?

Será que sou capaz de sentir com seus sentidos o frescor das cachoeiras e a resignação do zarpar à incerteza?

Será que sou capaz de me sentir como parte do todo, cumprindo meu propósito com a mesma leveza que você dança a dança da natureza?

Não sei o quanto sou capaz, mas com você eu aprendi que a vida é bela quando se enxerga a graciosidade de todas as etapas singulares.

E que a efemeridade da vida se dá pela intensidade em que ela é vivida.

-MM-

À minha família.

RESUMO

Leptophlebiidae é a maior família de Ephemeroptera em número de gêneros e a segunda maior em número de espécies. Dentre as regiões biogeográficas, a região Neotropical é a mais diversificada, contemplando 40% de todas as espécies da família. Nessa região, estima-se que 60% dos gêneros e 80% das espécies sejam endêmicos. Leptophlebiidae é um dos grupos mais estudados de Ephemeroptera na Neotropical, tendo sido dividida em diversos complexos durante as décadas de 1980 e 1990, com base exclusivamente em caracteres morfológicos. Contudo, para muitos dos complexos, nenhum ou poucos estudos foram realizados desde as proposições originais. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo verificar as relações cladísticas e o status taxonômico dos complexos de Leptophlebiidae que ocorrem na Região Neotropical. Para tanto, foram utilizados dois marcadores moleculares: Citocromo Oxidase subunidade I (COI, 394 pb) e a região D2-D3 do 28S DNA ribossomal (28SDNAr, 1231 pb). A matriz de dados foi composta por 155 táxons pertencentes a 53 gêneros, dos quais 29 são neotropicais, representando 70,7% da diversidade Neotropical da família. Nossas análises de Inferência Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (ML) recuperaram os Leptophlebiidae Neotropical em quatro clados distintos com altos valores de suporte (clado IV-VII), cada um proposto como uma subfamília: Terpidinae (clado IV), com representantes exclusivamente neotropicais (Escudo Guiana e Brasil); Choroterpinae (clado V) dividido em Choroterpini e Thraulini; Atalophlebiinae (clado VI), com representantes das regiões Madagascar, Australiana e Neotropical (Escudo Patagônia); e Hagenulinae (clado VII), com representantes exclusivamente neotropicais (Escudo Guiana e Brasil), tendo sido dividida em duas tribos, Haguenuini e Thraulodini, e cinco subtribos.

Palavras-chave: Filogenia, Hagenulinae, Gondwana, COI, 28S

ABSTRACT

Leptophlebiidae is the largest family of Ephemeroptera in number of genera and the second largest in number of species. Among the biogeographic regions, the Neotropical is the most diversified, with 40% of all species in the family. In this region, it is estimated that 60% of the genera and 80% of the species are endemic. Leptophlebiidae is one of the most studied groups of Ephemeroptera in Neotropical, having been divided in several complexes during the decades of 1980 and 1990, based exclusively on morphological characters. However, for many of the complexes, no one or few studies have been realized since the original propositions. Thus, the present study aimed to verify the cladistic relations and the taxonomic status of the complexes of Leptophlebiidae that occur in the Neotropical Region. Using two molecular markers: Cytochrome Oxidase subunit I (COI, 394 pb) and the D2-D3 region of 28S ribosomal DNA (28SDNAr, 1.231 pb). The data were composed of 155 taxa belonging to 53 genera, of which 29 are Neotropical, representing 70.7% of the Neotropical diversity of family. Our analyzes of Bayesian Inference (IB) and Maximum Likelihood (ML) recovered Neotropical Leptophlebiidae in four distinct clades with high support values (clade IV-VII), each proposed as a subfamily: Terpidinae (clade IV), with exclusively Neotropical representatives (Shield Guyana and Brazil); Choroterpinae (clade V) divided into Choroterpini and Thraulini; Atalophlebiinae (clade VI), with representatives of Madagascar, Australian and Neotropical (Patagonian Shield); And Hagenulinae (clade VII), with exclusively Neotropical representatives (Shield Guyana and Brazil), having been divided into two tribes, Haguenuini and Thraulodini, and five subtribes.

Key words: Phylogeny, Hagenulinae, Gondwana, COI, 28S, mayfly

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade <i>a posteriori</i> são mostrados acima dos ramos.	24
Figura 3.2 – Atalophlebolinguata. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade <i>a posteriori</i> são mostrados acima dos ramos.	26
Figura 3.3 – Clado V. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade <i>a posteriori</i> são mostrados acima dos ramos.....	27
Figura 3.4 – Clado VI. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade <i>a posteriori</i> são mostrados acima dos ramos.....	27
Figura 3.5 – Clado VII. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade <i>a posteriori</i> são mostrados acima dos ramos.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Gêneros de Leptophlebiidae utilizados no presente estudo. A presença do X indica que a sequenciamos o gene, ou *Genbank*, caso retiramos as sequências da plataforma online.....18

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
SUMÁRIO	XI
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Amostra.....	18
2.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	20
2.3 Inferências Filogenéticas	21
3 RESULTADOS	23
3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	23
3.2 Relações filogenéticas dentro de Leptophlebiidae	23
3.3 Relações filogenéticas dentro de Atalophlebolinguata Kluge, 2009.....	25
4 DISCUSSÃO.....	29
4.1 Leptophlebiinae e Habrophlebiinae.....	29
4.2 Atalophlebiinae Peters, 1980	29
4.3 Castanophlebiinae	30
4.4 Terpidinae	30
4.5 <i>Aprionyx</i> Barnard 1940	31
4.6 Atalophlebolinguata Kluge, 2009	32
4.7 Choroterpinae	32

4.8	Atalophlebiinae	32
4.8.1	Escudo da Patagônia (EP)	33
4.9	Escudo Guiana e Brasil (EGB).....	35
4.10	Haguenullinae	35
4.10.1	Hagenullini	35
4.10.2	Thraulodini	36
4.10.3	Hermanellina.....	36
4.10.4	Perda da asa posterior.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		39
APÊNDICES		45

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a ordem Ephemeroptera, é composta por 3341 espécies, 400 gêneros e 42 famílias. Seus representantes ocupam habitats de água doce do mundo todo, exceto na Antártica (Barber-James *et al.*, 2013. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/120>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017). Os Ephemeroptera viventes representam o que restou de um grupo muito diversificado de insetos voadores primitivos (Ephemerida). Sua origem data do final do Carbonífero ou do início do Permiano, cerca de 280 m.a.a., sendo uma das linhagens mais antigas dentre os Pterygota (Sartori & Brittain, 2015).

Leptophlebiidae Banks, 1900 são efemerópteros cosmopolitas e altamente diversificados morfologicamente, sendo a maior família em número de gêneros e a segunda maior em número de espécies, com aproximadamente 141 gêneros e 643 espécies (Sartori & Brittain, 2015). O representante mais antigo de Leptophlebiidae conhecido é o fóssil *Leptoneta calyptrata* Sinitshenkova, 1989 do Cretáceo Inferior, proveniente da formação Tsagantsab da Mongólia, datado em cerca de 130 m.a.a. (Sinitshenkova, 1989. Disponível em: http://fossilworks.org/bridge.pl?a=collectionSearch&taxon_no=71725&max_interval=Cretaceous&country=Mongolia&is_real_user=1&basic=yes&type=view&match_subgenera=1. Acesso em: 18 de janeiro de 2017).

A classificação interna de Leptophlebiidae ainda é alvo de discussões. Peters (1980) foi o primeiro a propor uma divisão interna da família, baseando-se em caracteres morfológicos como: as diferenças no aparelho bucal das ninfas e caracteres da asa e da genitália em adultos. O autor dividiu a família em duas subfamílias: Leptophlebiinae Banks, 1900, com oito gêneros de distribuição restrita ao Hemisfério Norte; e propôs uma nova subfamília, Atalophlebiinae, na qual incluiu todos os outros gêneros, com linhagens de pouco à extremamente especializadas. Atalophlebiinae é altamente diversificada e com representantes espalhados por todo o globo, sendo a maior diversidade observada no Hemisfério Sul (Peters, 1980).

Entretanto, Kluge (1994) questionou os caracteres utilizados para divisão em duas subfamílias. Em uma filogenia não quantitativa, baseando-se em dados morfológicos o autor propôs que os gêneros *Habrophlebia* Eaton, 1881 e *Habroleptoides* Schoenemund, 1929, até então alocados em Leptophlebiinae, deveriam fazer parte de uma nova subfamília, denominando-a Habrophlebiinae. Mais tarde, Kluge (2009), utilizando a mesma metodologia, restringiu Atalophlebiinae (*Atalophlebia*/fg5 =*Atalophlebolinguata*) e criou três subfamílias novas, sendo elas: Calliarcyinae (*Atalophlebia*/fg1 =*Atalophlebodentata*), Terpidinae (*Atalophlebia*/fg3 =*Atalophleboculata*) e Castanophlebiinae (*Atalophlebia*/fg4 =*Atalophlebimaxillata*). Tal divisão foi corroborada por Godunko (2015), por meio de uma filogenia também baseada em dados morfológicos.

Dentre as regiões biogeográficas, a região Neotropical é a mais diversificada, contemplando 40% de todas as espécies da família (Sartori & Brittain, 2015). Nessa região, Leptophlebiidae são dominantes em muitas bacias hidrográficas, tanto em termos de diversidade taxonômica quanto em abundância e endemismo (Peters & Peters, 1980; Towns & Peters, 1996; Salles *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2013; Sartori & Brittain, 2015). Estima-se que nessa região 60% dos gêneros e 80% das espécies sejam endêmicos (Pescador *et al.*, 2001). Atualmente há registros de 41 gêneros para a região (Domínguez *et al.*, 2013) e 247 espécies (Sartori & Brittain, 2015). Apesar da grande variedade de táxons, o conhecimento sobre a diversidade da família na região continua crescendo, o que os tornam um dos grupos mais estudados de Ephemeroptera na região, tanto em relação à taxonomia (e.g. Peters, 1969; Savage, 1982; Flowers & Domínguez, 1991; Mariano, 2011), quanto à sistemática (e.g. Savage, 1983; Pescador e Peters; 1990; Domínguez, 1995, 2001, 2009; Sartori, 2005; Salles & Domínguez, 2012; Gonçalves *et al.*, 2012) e biogeografia (e.g. Savage, 1987, 2005; Domínguez, 1999).

A partir da década de 80, diversos autores sugeriram a divisão dos atalophlebiíneos neotropicais em diversos complexos ou linhagens supostamente monofiléticos. Savage (1987), seguindo a classificação de Peters (1980), dividiu os Atalophlebiinae neotropicais em dois grandes grupos: o Escudo da Patagônia, não monofilético, composto por 10 gêneros adaptados ao clima frio, e com linhagens relacionadas às regiões Oriental, Oceânica e Australiana; e o Escudo Guiana e Brasil, monofilético, composto por 24 gêneros adaptados a climas mais quentes, com linhagens

endêmicas, refletindo o isolamento pela formação do Atlântico há 80 m.a.a. até a formação do istmo do Panamá há 5 m.a.a.. Entretanto o autor não utilizou análises filogenéticas para tais divisões. Os gêneros do Escudo da Patagônia foram divididos em cinco linhagens ou complexos, sendo apenas uma delas (*Penaphlebia*: *Penaphlebia* Peters e Edmunds, 1972 e *Massartella* Lestage, 1930) restrita ao continente sul-americano, as demais linhagens contêm gêneros neotropicais e dos demais continentes gondwânicos, sendo elas: Linhagem Hapsiphlebia, Linhagem Nousia, Linhagem Meridialaris e Linhagem Dactylophlebia (Savage, 1987). Já alguns gêneros do Escudo Guiana e Brasil foram alocados em cinco linhagens ou complexos, restritos à América do Sul, supostamente monofiléticos, sendo eles: Complexo Miroculis (Savage, 1982), Linhagem Terpides (Savage, 1986), Linhagem Farrodes (posteriormente denominada Homothraulus), Linhagem Hagenulopsis (Savage, 1987) e Complexo Hermanella (Flowers & Domínguez, 1991; Sartori, 2005; Lima *et al.*, 2012). Os gêneros *Atopophlebia* Flowers, 1980, *Ulmeritus* Traver, 1956, *Perissophlebiodes* Savage, 1983 e *Thraulodes* Ulmer, 1919 continuaram com a posição filogenética indeterminada. Posteriormente, dois novos complexos foram propostos, os quais são: *Ulmeritus/Ulmeritoides* (Domínguez, 1991, 1995; Salles & Domínguez, 2012) e *Perissophlebiodes* (Domínguez, 2009). No entanto, poucos estudos visando rever o monofiletismo dos grupos e a relação entre os gêneros foram realizados desde as proposições originais (Domínguez *et al.*, 2001; Domínguez, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012;).

Savage (1987) propôs que os gêneros dos complexos citados surgiram na Região Neotropical e, portanto, denominou-os como Atalophlebiinae neotropicais. Além dos Atalophlebiinae neotropicais, também é possível encontrar na região o complexo *Choroterpes* (Atalophlebiinae), com distribuição mundial, exceto na Antártica e nas regiões Australiana e Oceânica. O complexo é dividido em dois gêneros: *Choroterpes* Eaton 1881, o qual é dividido em três subgêneros: *Choroterpes*, *Euthraulus* Barnard, 1932 e *Cryptopenella* Guillies, 1951; e *Neochoroterpes* Allen, 1974, o qual foi elevado à categoria de gênero sem nenhuma explicação por Henry (1993) *apud* (Flowers, 2009). Peters (1988) propôs que a origem do complexo *Choroterpes* seja gondwânica com posterior expansão, enquanto Flowers (2009) não sugere a origem, mas indica que a diversificação do grupo se deu através do mar de Tétis no Mesozoico.

Como demonstrado, a sistemática de Leptophlebiidae fundamenta-se principalmente em caracteres morfológicos, e para muitos dos complexos mencionados pertencentes à Região Neotropical, nenhum ou poucos estudos visando investigar o monofiletismo foram realizados desde as proposições originais, como é o caso dos complexos Miroculis, Terpides e Hagenulopsis. Em outros, por exemplo, Homothraulius, filogenias com dados morfológicos apontaram que o grupo, ao menos como inicialmente proposto, seja parafilético (e.g. Domínguez, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012). O complexo Hermanella, o mais diverso dentre os mencionados, tem sido alvo de debates, tanto a relação entre os seus membros, quanto à atribuição correta de algumas espécies, e até mesmo o status supra específico de alguns táxons ainda são conflituosos (Sartori, 2005; Kluge, 2007). Kluge (2007) fez uma revisão de alguns dos Atalophlebiinae neotropicais e propôs um novo táxon, nomeado Hermanellonota, que inclui dois complexos genéricos: o complexo Hermanella (ou Hermanelloognatha) sensu Kluge (2007) e o complexo Homothraulius. No mesmo artigo, o autor considerou que a instabilidade das espécies dentro do complexo Hermanella seja um reflexo da classificação atual (Flowers & Domínguez, 1991; Sartori, 2005), e por isso considerou o complexo como um único gênero Hermanella Needham & Murphy 1924, dividido em cinco subgêneros: Hermanella, Needhamella Dominguez e Flowers 1989, Leentvaaria Demoulin 1966, Traverella Edmunds 1948 e Hylister Dominguez & Flowers 1989 (*Hydrosmilodon* Flowers & Dominguez 1992 e *Paramaka* Savage & Dominguez 1992 foram considerados sinônimos juniores de Needhamella).

O' Donnell e Ockusch (2008) propuseram a primeira filogenia molecular para família, utilizando dois marcadores moleculares nucleares (região D2-D3 do RNA ribossomal 28s e a histona H3). No entanto suas análises não contemplaram a maioria dos complexos citados. As autoras não recuperaram Atalophlebiinae como monofilético, mas revelaram quatro grupos principais, sendo eles: grupo *Malagasy*, grupo *Paleoaustral*, grupo *Choroerpes* (= Complexo *Choroerpes*) e grupo *Thraulodes*, sendo o último formado exclusivamente por três gêneros neotropicais (*Thraulodes*, *Farrodes* e *Traverella*). Além do exposto, Leptophlebiinae e Habrophlebiinae foram recuperados como independentes e monofiléticos.

Embora amplamente utilizado, sabe-se que caracteres morfológicos, de modo geral, são passíveis de convergência adaptativa (Scotland *et al.*, 2003), podendo levar à

reconstrução de hipóteses evolutivas baseadas em homoplasias (Hedges & Sibley, 1994; Gatesy *et al.*, 1996). Em Ephemeroptera, diversos autores discutiram sobre a provável natureza homoplástica e convergente de vários caracteres usados para definir limites taxonômicos em toda ordem, como por exemplo: venações das asas e morfologia do ovo e das brânquias abdominais (Sivaramakrishnan & Venkataraman, 1987; McCafferty & Wang, 1994; Wang *et al.*, 1995; Peters & Edmunds, 1964; Wang & McCafferty, 1996). Kluge (2007), inclusive, adverte que nenhum caráter pode ser associado a nenhum *rank* taxonômico, pois o mesmo só tem significância quando aplicado a determinados táxons. E propôs que a alta diversidade genérica de Leptophlebiidae esteja relacionada ao se associar determinados caracteres a gênero, e qualquer variação nessa característica selecionada significa um novo gênero, resultando em um alto índice de gêneros monotípicos. Em contrapartida, os dados moleculares oferecem uma linha independente de evidências, o que os permitem auxiliar na distinção entre sinapomorfias e homoplasias (Scotland *et al.*, 2003).

Diante do exposto a obtenção de dados moleculares pode ser capaz de fornecer relevantes subsídios para a compreensão das relações internas da família, inclusive dos Leptophlebiidae da Região Neotropical. Sendo assim, de forma pioneira, o presente estudo teve como objetivo verificar as relações cladísticas e o status taxonômico dos complexos de Leptophlebiidae que ocorrem na Região Neotropical utilizando dois marcadores moleculares, além de comparar com as hipóteses propostas previamente baseadas em dados morfológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Foram obtidas no presente estudo 108 sequências de DNA oriundas de exemplares depositados na Coleção Zoológica Norte Capixaba da Universidade Federal do Espírito Santo (CZNC). Além disso, foram obtidas no GenBank 47 sequências (Apêndice 1). No total, utilizou-se 155 sequências pertencentes a 53 gêneros, dos quais 29 são neotropicais (Tabela 2.1). Como grupos externos foram utilizados dois exemplares da família Oligoneuridae (Ephemeroptera), *Oligoneuria amazonica* e *Homoneuria watu*. A nomenclatura de distribuição zoogeográfica usada para os espécimes seguiu a proposto por Holt *et al.* (2013).

Tabela 2.1 – Gêneros de Leptophlebiidae utilizados no presente estudo. A presença do X indica que a sequenciamos o gene, ou Genbank, caso retiramos as sequências da plataforma online.

	Gênero	COI	28S rDNA
1	<i>Acantophlebia</i>		Genbank
2	<i>Adenophlebia</i>		Genbank
3	<i>Aprionyx</i>		Genbank
4	<i>Aracnocolus</i>		Genbank
5	<i>Askola</i>	X	X
6	<i>Atalomicria</i>		Genbank
7	<i>Atalophlebia</i>	X	X
8	<i>Austroclima</i>		Genbank
9	<i>Austroplhebiodes</i>		Genbank
10	<i>Castanophlebia</i>		Genbank
11	<i>Chorotherpes</i>	X	X
12	<i>Deleatidium</i>		Genbank
13	<i>Ecuaphlebia</i>	X	X
14	<i>Euthraululus</i>		Genbank
15	<i>Farrodes</i>	X	X
16	<i>Fittkaulus</i>	X	X
17	<i>Habroleptoides</i>		Genbank
18	<i>Habrophelbia</i>	X	Genbank

	Gênero	COI	28S rDNA
19	<i>Hagenulopsis</i>	X	X
20	<i>Hermanella</i>	X	X
21	<i>Hermanellopsis</i>	X	X
22	<i>Gen. ind. 2</i>	X	X
23	<i>Hydromastodon</i>	X	X
24	<i>Hydrosmilodon</i>	X	X
25	<i>Hylister</i>	X	X
26	<i>Isothraululus</i>		Genbank
27	<i>Jappa</i>		X
28	<i>Koornonga</i>		Genbank
29	<i>Leentvaaria</i>	X	X
30	<i>Leptophlebia</i>	X	X
31	<i>Gen. ind.1</i>	X	X
32	<i>Massartella</i>	X	X
33	<i>Massartelopsis</i>		X
34	<i>Meridialaris</i>	X	X
35	<i>Microphlebia</i>	X	X
36	<i>Miroculis</i>	X	X
37	<i>Needhamella</i>	X	X
38	<i>Neochotherpes</i>		Genbank
39	<i>Neozephlebia</i>		Genbank
40	<i>Nousia</i>	X	X
41	<i>Paraleptophlebia</i>	Genbank	Genbank
42	<i>Paramaka</i>	X	X
43	<i>Perissophlebiodes</i>	X	X
44	<i>Radima</i>		Genbank
45	<i>Simothraulopsis</i>	X	X
46	<i>Tepakia</i>		Genbank
47	<i>Terpides</i>	X	X
48	<i>Thraulodes</i>	X	X
49	<i>Thraululus</i>	X	X
50	<i>Tikuna</i>	X	X
51	<i>Traverella</i>	X	X
52	<i>Ulmeritoides</i>	X	X
53	<i>Zephlebia</i>		Genbank

2.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A extração de DNA total foi realizada a partir de três pernas de cada animal, utilizando o kit de extração Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega), diluindo a amostra em média a 100µl em ddH₂O.

Foram utilizados o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e os segmentos nucleares (regiões D2-D5) do gene nuclear do RNA ribossomal 28s (RNAr 28S). As amplificações dos fragmentos foram feitas utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), em um volume final de 25 µl, com 1 µl de DNA molde em um termociclador.

Para amplificar o gene COI, foram utilizados os primers universais LCO1409 e HCO2198, específicos para os ~650 pb iniciais do gene (Folmer *et al.* 1994). Para cada 1µL de DNA genômico extraído, foram adicionados: 2,5µL de Invitrogen® Buffer MgCl₂ 10x; 2 µL de Invitrogen® MgCl₂ 50mM; 0,3 µL de cada primer (5mM); 1 µL de Promega® DNTp 100mM; 17,775 µL de água ultra-pura (ddH₂O); e 0,125 µL de Invitrogen® Platinum Taq DNA Polymerase. O fragmento foi amplificado de acordo com o perfil: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94° C por 45 segundos, 47°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e extensão final da fita a 72°C por 5 minutos.

Para o gene 28s foram utilizados os primers D23549F e D54749R, específicos para os ~1200 pb da região D2-D5 (Gillespie *et al.*, 2004, 2005). Para cada 1µL de DNA genômico extraído, foram adicionados: 2,5µL de Invitrogen® Buffer MgCl₂ 10x; 2 µL de Invitrogen® MgCl₂ 50mM; 0,3 µL de cada primer (5mM); 1 µL de Promega® DNTp 100mM; 1 µL de DMSO; 17,775 µL de água ultra-pura (ddH₂O); e 0,125 µL de Invitrogen® Platinum Taq DNA Polymerase. O fragmento foi amplificado de acordo com o perfil: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94° C por 1 minuto, 52°C por 90 segundos, 72°C por 1 minuto, e extensão final da fita a 72°C por 5 minutos.

O sucesso da amplificação foi verificado através da eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação ExoSAP-IT (USB Corporation) em que foi usado 1uL para cada 10uL de

produto PCR. As amostras purificadas foram sequenciadas na empresa MacroGen Inc. Korea (<http://dna.macrogen.com>). Foi gerada a sequência da fita senso de DNA para o COI utilizando-se o primer LCO1490 (e antissenso quando necessário), e ambas as fitas foram sequenciadas para o 28S.

2.3 Inferências Filogenéticas

As sequências geradas foram submetidas à ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar se as mesmas correspondiam ao grupo e região gênica de interesse. Posteriormente, as sequências de COI foram alinhadas no programa Geneious 7.1.3 através do algoritmo ClustalW utilizando-se os valores padrões nos parâmetros de alinhamento, juntamente com o alinhamento manual para a conferência de possíveis incongruências entre a matriz de dados e o eletroferograma. As sequências do 28s foram alinhadas separadamente utilizando o portal MAFFT (v.7; <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>), por meio da estratégia E-INS-I.

A etapa de reconstrução filogenética foi realizada após ter sido verificado o grau de saturação das sequências no programa DAMBE 6.0.48, através do teste de Xia *et al.* (2003). Além disso, foi utilizado o programa JModelTest 0.1 (Posada, 2008) para determinar o modelo evolutivo mais adequado a ser utilizado nas análises, selecionado pelo critério de informações Bayesiano.

As análises filogenéticas dos genes concatenados foram inferidas utilizando-se os métodos de Inferência Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (ML). As árvores de IB foram inferidas pelo programa Mr.Bayes 3.1 na plataforma online CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>) com o modelo evolutivo proposto pelo JModelTest particionado para cada gene. A cadeia de Markov foi conduzida com 30 milhões de gerações com burn-in de 25% amostrando a cada 1000 gerações, assegurando que o desvio padrão médio das frequências ficaram abaixo de 0,01 e observando a estabilização das cadeias no Tracer V1.6 (Rambaut *et al.*, 2016). O suporte dos ramos foi obtido através das probabilidades posteriores e a confiabilidade dos clados foi aceita de acordo com a proposta por Hillis e Bull (1993), sendo elas: forte (>0.95) e moderada (entre 0.85 e 0.95). As árvores de ML foram

inferidas pelo programa RaxML (Stamatakis, 2014), na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>), empregando o modelo evolutivo proposto pelo JModelTest particionado para cada gene. O suporte dos ramos foi obtido através do *Bootstrap* e a confiabilidade dos clados foi aceita de acordo com a proposta por Hillis e Bull (1993), sendo elas: forte (>70%) e moderada (entre 50% e 70%). A visualização e edição da árvore filogenética foi realizada no programa FigTree v1.0.4.

3 RESULTADOS

3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Dos 481 exemplares selecionados, 295 (61%) amplificaram para o COI e 136 (28%) para o 28S, contemplando 29 gêneros neotropicais e um não neotropical. Mais 23 gêneros, oriundos das outras regiões geográficas foram adicionados à amostra com sequências obtidas do GenBank. A amostra final, somando-se as amostras do grupo externo, contou com 155 táxons.

Como a terceira posição do códon do COI mostrou-se saturada, após o alinhamento final a matriz ficou com 394 pb. Para o 28S, após o alinhamento as sequências geraram uma matriz de 1.231 pb. A matriz com os dados concatenados apresentou 1.625 pb. O modelo evolutivo que melhor se adequou às análises foi o GTR+I+G, para ambos os genes.

3.2 Relações filogenéticas dentro de Leptophlebiidae

As árvores geradas pelos diferentes critérios de otimização (ML e IB) mostraram topologias semelhantes e, portanto, optou-se por demonstrar a árvore da Inferência Bayesiana (IB). Através da filogenia obtida a partir dos dados concatenados pela IB (Figura 3.1), foi possível recuperar sete linhagens evolutivas principais. O clado I (BT=100, PP=1.0) foi formado pelos gêneros *Leptophlebia* e *Paraleptophlebia*. O clado III (BT=100, PP=1.0) foi formado pelos gêneros *Habrophlebia* e *Habroleptoides*. O clado IV (BT=100, PP=1.0) foi formado pelos gêneros *Terpides* + (*Tikuna* + *Fittkaulus*). O gênero *Aprionyx*, como mostra a Figura 3.1, foi recuperado como grupo irmão do clado IV na IB com suporte moderado (IB=0.87). Entretanto tal agrupamento não teve suporte estatístico na filogenia de ML (Apêndice 2). A maior linhagem recuperada foi o clado Atalophlebolinguata Kluge, 2009 (IB=0.99), tendo sido formado por todos os outros gêneros analisados (Clados V-VII). O valor do

suporte entre os clados I, II, III, IV e Atalophlebolinguata foram fracas, inferiores à 0.85 para IB e inferiores à 50% para ML.

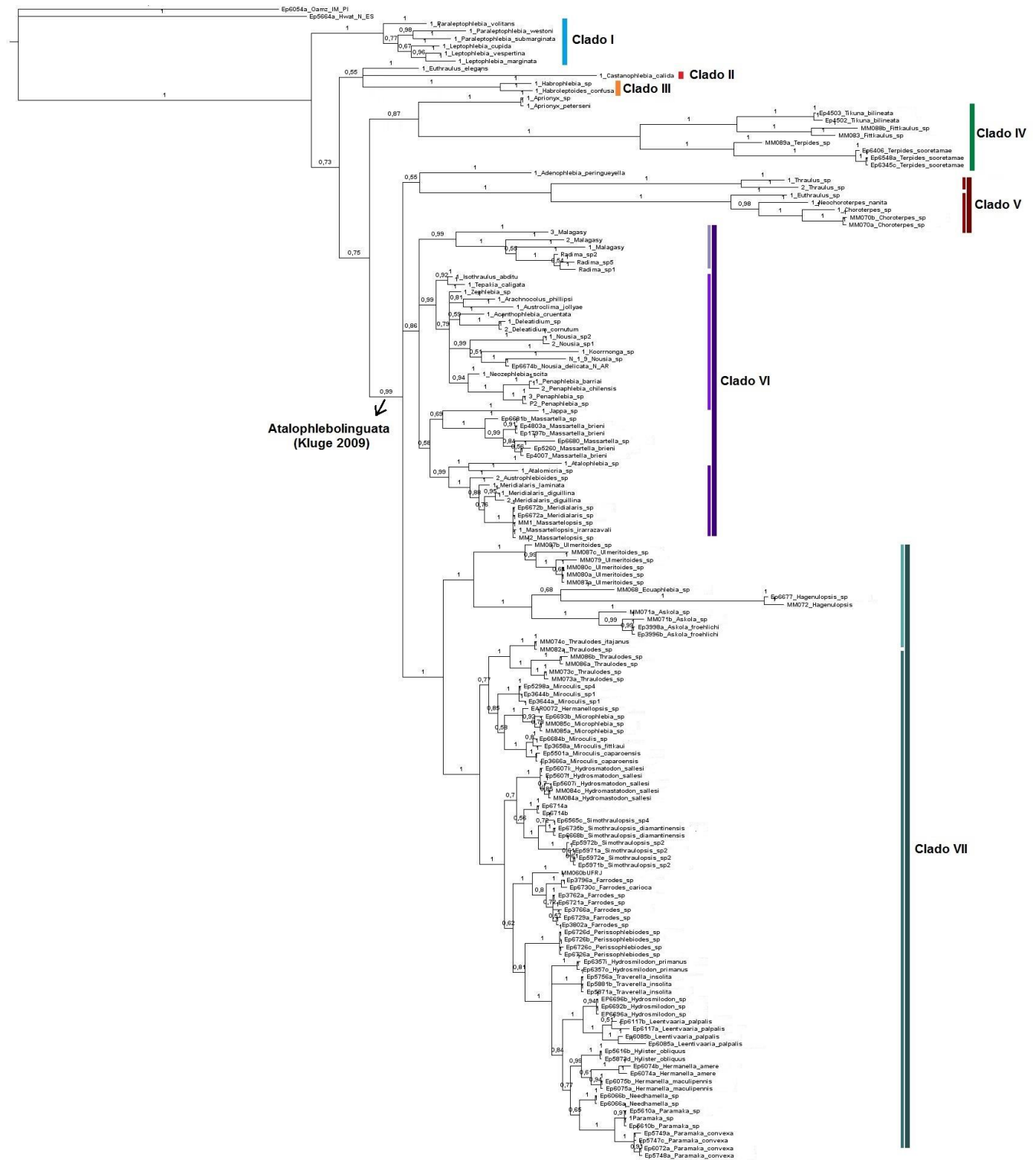


Figura 3.1 – Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

3.3 Relações filogenéticas dentro de Atalophlebolinguata Kluge, 2009

Através da filogenia obtida a partir dos dados concatenados pela IB (**Figura 3.2**), foram recuperados três grupos principais em Atalophlebolinguata. O clado V (BT=100, IB=1.0), representado pelos gêneros *Thraululus* + (*Euthraululus* + (*Neochoreterpes* + *Choroerpes*)). O clado VI (IB=0.86), representado pelos gêneros das regiões (Madagascar) + (Australiana + Neotropical) + (Australiana + Neotropical). E o clado VII (BT=82, IB=1.0), representado exclusivamente por gêneros neotropicais. O gênero *Adenophlebia* foi recuperado como pertencente à Atalophlebolinguata (**Figura 3.2**), porém não foi recuperado com nenhum dos três clados formados.

Dois clados foram recuperados dentro do clado V, sendo um formado por (*Choroerpes* + *Neochoroerpes*) + *Euthraululus* (clado V.1), e outro por *Thraululus* (clado V.2), ambos com valor de suporte 1.0 (**Figura 3.3**). Dentro do clado VI, foi verificada a formação de três grupos principais com suporte de 0.99 cada um (**Figura 3.4**). O clado VI.1 contempla representantes de Madagascar, sendo o gênero *Radima* e três identificados como “Malagasy”. O grupo VI.2 e VI.3 com representantes australianos e neotropicais. Dentro do clado VII, vemos a formação dois clados principais (clado VII.1 e clado VII.2), dos quais se dividem em cinco clados (**Figura 3.5**). O clado VII.1.1, com valor de supor 1.0, contempla representantes do gênero *Ulmeritoides*. O clado VII.1.2, com valor de supor 1.0, contempla os gêneros *Askola* + (*Hagenulopsis* + *Ecuaphlebia*). O clado VII.2.1, com valor de supor 1.0, contempla representantes do gênero *Thraulodes*. O clado VII.2.2, com valor de supor 0.85, contempla os gêneros *Miroculis* (parafilético), *Microphlebia* e *Hagenulopsis*. E o clado VII.2.3, com valor de suporte 1.0, contempla os gêneros *Hydromastodon*, *Simothraulopsis*, *Farrodes*, *Perissophlebiodes*, *Hydrosmilodon*, *Traverella*, *Leentvaaria*, *Hylister*, *Hermanella*, *Paramaka*, *Needhamella* e dois gêneros indeterminados.

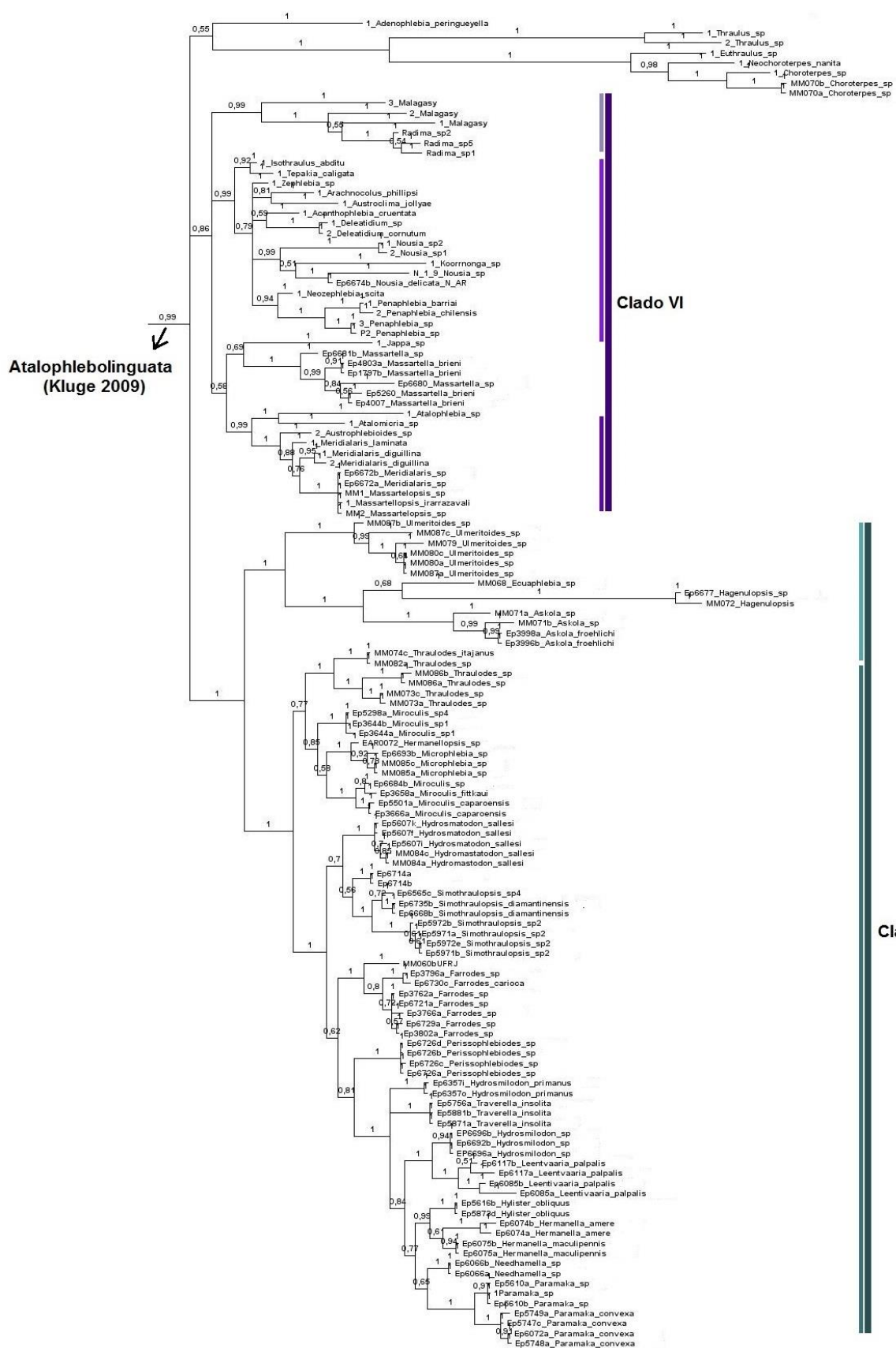


Figura 3.2 – Atalophlebolinguata. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

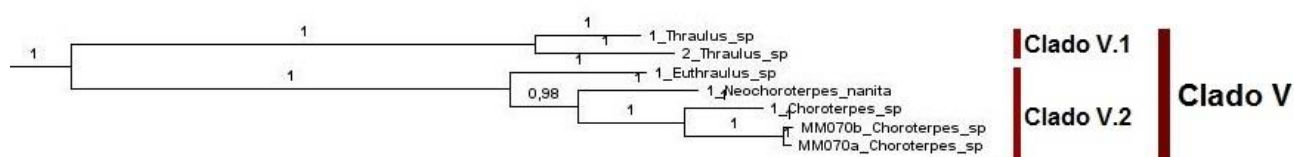


Figura 3.3 – Clado V. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

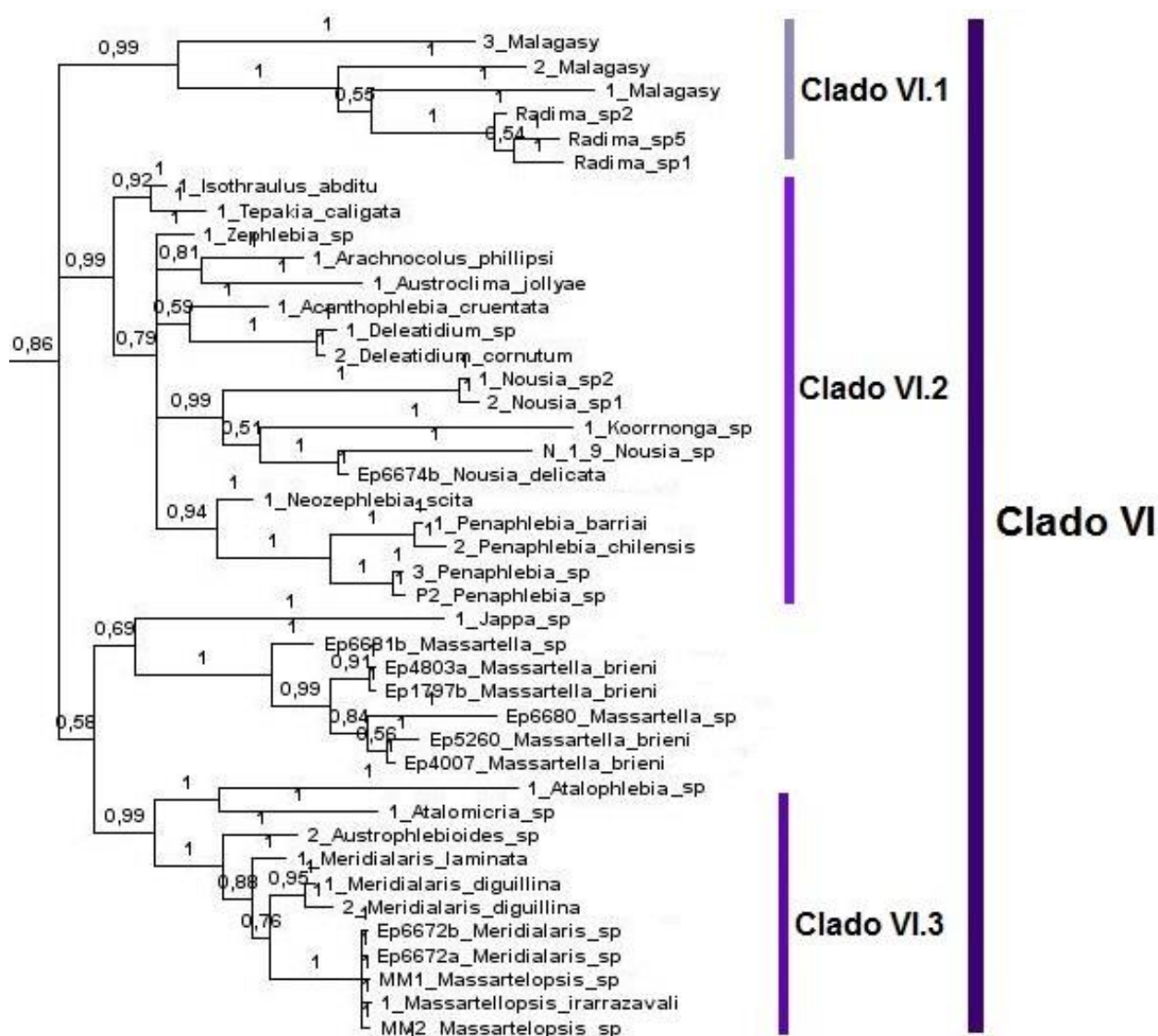


Figura 3.4 – Clado VI. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

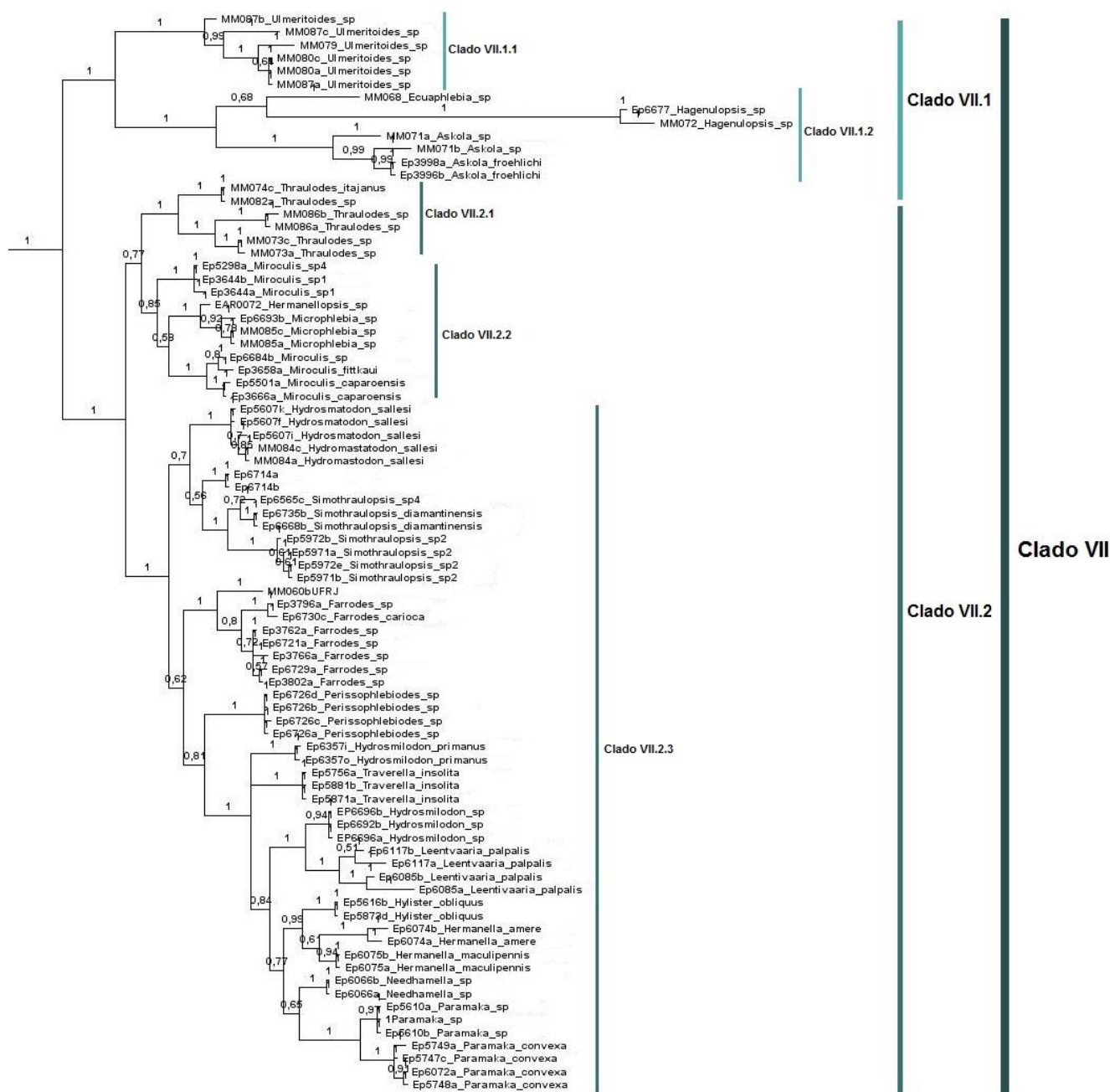


Figura 3.5 – Clado VII. Inferência filogenética bayesiana dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

4 DISCUSSÃO

Todos os 29 gêneros amostrados da região neotropical encontram-se nos clados IV-VII. No presente estudo, focaremos principalmente nos gêneros que ocorrem na Região Neotropical.

4.1 Leptophlebiinae e Habrophlebiinae

O clado I foi formado pelos gêneros *Leptophlebia* Westwood, 1840 e *Paraleptophlebia* Lestage, 1917. *Paraleptophlebia* foi recuperado como parafilético, assim como encontrado por O'Donnel & Jockusch (2008) em sua filogenia molecular, e proposto por Peters e Edmunds (1970) através de dados morfológicos. O clado citado representa Leptophlebiinae, exceto por não ter sido incluído na análise os gêneros: *Habroleptoides* Schoenemund 1929, *Dipterophlebiodes* Demoulin, 1954 e *Gilliesia* Peters & Edmunds, 1970.

Como proposto por Kluge (1994), nossas análises recuperaram no clado III, Habrophlebiinae, os gêneros *Habrophlebia* e *Habroleptoides*, em um clado distinto de Leptophlebiinae (**Figura 3.1**).

4.2 Atalophlebiinae Peters, 1980

Com exceção dos gêneros das famílias Leptophlebiinae, Habrophlebiinae e Calliarcyinae Kluge, 2009 (formada pelo gênero *Calliarcys* Eaton, 1881), até a proposta de Kluge (2009), todos os demais gêneros de Leptophlebiidae pertenciam à Atalophlebiinae. Nossos dados moleculares não recuperaram como monofilética tal proposição de subfamília, entretanto, ofereceram suporte para diversos outros grupos com estes gêneros (subfamílias, tribos e subtribos).

4.3 Castanophlebiinae

Kluge (2009) propôs a elevação taxonômica do gênero *Castanophlebia* (espécie tipo: *Castanophlebia calida*) à subfamília Castanophlebiinae. Em nossas análises *Castanophlebia cálida* (Genbank EU874527.1/ clado II) não foi recuperada com nenhum dos clados formados (**Figura 3.1**), assim como observado em O'Donnell & Jockusch (2008). Tal conformação está de acordo com a hipótese de Kluge (1994).

Região Neotropical

4.4 Terpidinae

O clado IV foi formado pelos gêneros *Terpides*, *Tikuna* e *Fittkaulus* (**Figura 3.1**). No presente estudo propomos a primeira filogenia interna do grupo, sendo *Terpides* + (*Tikuna*+*Fittkaulus*). Tais gêneros foram agrupados pela primeira vez por Savage (1986), nomeando-os complexo *Terpides*. Os representantes do complexo possuem características peculiares, tanto nas ninfas quanto nos adultos, quando comparados com os outros gêneros de Leptophlebiidae (Savage, 1986; Savage *et al.*, 2005). A combinação das peças bucais hipognatas e a presença de fileiras de cerdas nos filamentos caudais os tornam únicos dentre os leptophlebiídeos, resultando em ninfas com características semelhantes à Baetidae e Siphonuridae (Savage, 1986). No mesmo artigo, o autor propôs que o complexo fazia parte de Atalophlebiinae Peters, 1980, e seria grupo irmão de todos os outros gêneros da subfamília devido às suas características morfológicas. Posteriormente Savage (1987), devido à distribuição restrita do grupo ao Escudo Guiana e Brasil, propôs que o complexo, junto com outros complexos propostos, formaria um grupo monofilético pertencente ao Escudo Guiana e Brasil, com linhagens endêmicas, refletindo o isolamento pela formação do Atlântico há 80 m.a.a. até a formação do istmo do Panamá há 5 m.a.a. Entretanto, nenhuma filogenia foi proposta para corroborar tais proposições, nem para relação interna do complexo, supostamente monofilético. Em uma proposta alternativa, Kluge (2009) baseando-se em dados morfológicos, restringiu Atalophlebiinae (*Atalophlebia*/fg5 =*Atalophlebolinguata*) e criou três subfamílias novas, sendo elas: Calliarcyinae (*Atalophlebia*/fg1 =*Atalophlebodentata*), Castanophlebiinae (*Atalophlebia*/fg4 =*Atalophlebimaxillata*) e elevou o complexo em

nível de subfamília: Terpidinae (Atalophlebia/fg3 =Atalophleboculata). Posteriormente, Godunko et al. (2015) corroboraram a classificação de Kluge (2009) através de análises filogenéticas com base em dados morfológicos. Ao contrário do proposto por Savage (1987), o clado IV do presente trabalho, que inclui exclusivamente os gêneros do complexo Terpides, não foi agrupado com os demais complexos do Escudo Guiana e Brasil (Clado VII). Nossos resultados corroboram os propostos por Kluge (2009), visto que além dos representantes não terem sido recuperados com os demais representantes dos complexos do Escudo Guiana e Brasil (Clado VII), os representantes da linhagem Terpides não se encontram em Atalophlebolinguata Kluge, 2009 (Atalophlebiinae sensu Kluge 2009). Nossos dados, portanto, sustentam a categoria em nível de subfamília proposta por Kluge (2009) para a linhagem que inclui os gêneros *Terpides*, *Tikuna* e *Fittkaulus* (e.g. Terpidinae).

4.5 *Aprionyx* Barnard 1940

Aprionyx é um gênero com distribuição na Afrotropical. Pescador & Peters (1980) propuseram que o gênero fazia parte do complexo Hapsiphlebia, linhagem com representantes das regiões Australiana e Neotropical (Escudo da Patagônia). Kluge (2009), por sua vez, propôs que o gênero pertencesse a Atalophlebolinguata devido à presença de um par de processos laterais na hipofaringe, caráter diagnóstico do grupo. Entretanto Kluge (2012) observou que diferente dos Atalophlebolinguata que perderam a dentiseta distal, em *Aprionyx* tal caráter é retido assim como em Terpidinae. Entretanto Terpidinae não possuem o par de processos laterais na hipofaringe. Nossos dados recuperaram o gênero *Aprionyx* como grupo irmão de Terpidinae (clado IV, **Figura 3.1**). O clado (*Aprionyx*+Terpidinae)+Atalephlebolinguata, apesar de não possuir forte suporte estatístico, caso confirmado, indica que a ausência do par de processos laterais na hipofaringe tenha sido uma possível reversão em Terpidinae. Ademais, o relacionamento entre Terpidinae e *Aprionyx* sugere que os ancestrais do clado começaram a se isolar durante a separação entre as duas regiões através do movimento das placas tectônicas.

4.6 Atalophlebolinguata Kluge, 2009

Kluge (2009) propôs que os Atalophlebolinguata são agrupados pela presença de um par de processos laterais na hipofaringe. Tal agrupamento é representado pela maioria dos leptophlebiídeos e possuem distribuição mundial. No mesmo artigo o autor propôs que a possível classificação do grupo aplicável ao Código Internacional de Nomenclatura Zoológica seja subfamília Atalophlebiinae. Nossos dados recuperaram Atalophlebolinguata como monofilético, dentro do qual foi possível observar a formação de três clados principais (V, VI, e VII). Todavia sugerimos que cada um desses três clados dentro de Atalophlebolinguata seja considerado como uma subfamília (**Figura 3.2**).

Adenophlebia Walker, 1860, gênero com distribuição Afrotropical, foi recuperado neste clado, conforme proposto por Kluge (2009). Porém, além de não ter sido aqui recuperada a sua relação com os demais representantes do grupo, o gênero não fez parte de nenhum clado interno formado.

4.7 Choroterpinae

O clado V (**Figura 3.3**) foi representado pelos gêneros *Chorotheops* e *Thraulius*, mesmo grupo recuperado por O'Donnel & Jockusch (2008) (Group Choroterpes) e Kluge (2012) (Tribo Choroterpini). Assim como proposto por Kluge (2012), o clado V mostrou-se dividido em dois clados (clado V.1 e clado V.2, **Figura 3.3**). Propomos que Choroterpini Kluge, 2012 seja elevada a categoria de subfamília: Choroterpinae, e os clados internos sejam nomeados como tribo, sendo eles: *Thraulius*/g1 Kluge, 2012 como Thraulini; e *Chorotheops*/g2 Kluge, 2012 como Choroterpini. Todos os caracteres morfológicos que sustentam a subfamília e as tribos foram propostos por Kluge (2012).

4.8 Atalophlebiinae

Com base em dados geológicos, Herrington (1962) propôs que a América do Sul possui uma longa história e é composta por escudos formados entre o Pré-

Cambriano e o Cambriano Inferior. Tomando como base tais informações, Savage (1987) propôs que os leptophlebiídeos neotropicais possuem uma longa história evolutiva. O autor propôs que as linhagens do escudo da Patagônia sejam mais relacionadas com os indivíduos das regiões: Australiana, Madagascar e Afrotropical, propondo que os ancestrais do escudo começaram a se isolar entre as regiões Afrotropical e Madagascar há aproximadamente 130 milhões de anos. Tais relacionamentos podem ser vistos na formação do clado VI (**Figura 3.4**). O clado citado foi formado por gêneros das regiões: Neotropical (Escudo da Patagônia), Australiana e Madagascar, mesmo agrupamento encontrado por O'Donnel & Jockusch (2008). Assim, propomos que o clado seja tratado como Atalophlebiinae.

O clado VI.1 foi formado por táxons oriundos de Madagascar, gênero *Radima* Akers & Peters & Peters, 2003 e táxons nomeados *Malagasy* (**Apêndice 1**). Mesmo clado (Malagasy group) foi encontrado por O'Donnel & Jockusch (2008). O gênero *Radima* até então era alocado como *incertae sedis* em Atalophlebolinguata. Propomos que o mesmo seja alocado em Atalophlebiinae e o complexo *Radima* seja tratado como tribo Radimini.

4.8.1 Escudo da Patagônia (EP)

Savage (1987) dividiu os gêneros neotropicais do EP em cinco linhagens. Segundo o autor apenas a linhagem *Penaphlebia* seria formada por representantes exclusivamente neotropicais. As demais seriam formadas por gêneros distribuídos nas outras regiões gondwânicas, incluindo a Neotropical. No presente estudo, encontramos os gêneros das regiões Neotropical (EP) e Australiana juntos em dois clados principais, sendo eles: VI.2 e VI.3 (**Figura 3.4**).

Não recuperamos a linhagem *Penaphlebia* como um grupo monofilético. Enquanto o gênero *Massartella* foi recuperado no clado VI, *Penaphlebia* foi recuperado no clado VI.2 (**Figura 3.4**) relacionado ao táxon *Neozephlebia* Penniket, 1961. *Neozephlebia* foi descrito como subgênero do gênero *Zephlebia* Penniket, 1961, mas apesar de terem sido recuperados no mesmo clado (VI.2), não formaram um grupo monofilético.

Além dos táxons citados, o clado VI.2, é formado pelos gêneros com distribuição na Região Australiana: *Aracnocolus* Towns & Peters, 1979b, *Austroclima* Towns e

Peters, 1979, *Acantophlebia* Towns, 1983, *Deleatidium* Eaton, 1899, *Nousia* Navas, 1918, *Koornonga* Campbell e Suter, 1988, *Isothraulus* Towns e Peters, 1979, *Tepakia* Towns e Peters, 1996 (**Figura 3.4**). Os gêneros *Isothraulus* e *Tepakia* foram recuperados como um clado grupo irmão dos demais, entretanto tal relação possui fraco suporte estatístico.

A formação do clado *Nousia* + *Koornonga* indica a clara relação entre as regiões Neotropical (EP) e Australiana. O gênero *Nousia* possui distribuição em ambas as regiões, enquanto *Koornonga* encontra-se distribuído apenas na Australiana. Não foi possível recuperar a relação entre esses gêneros, pois observou-se uma politomia entre os espécimes de *Nousia* de ambas as regiões (**Apêndice 1**) e *Koornonga*.

Apesar de não termos amostrados todos os gêneros das linhagens, não recuperamos nenhuma linhagem proposta na literatura como monofilética. Dentre os gêneros citados, o clado VI.2 recuperou representantes tanto da Neotropical (EP) quanto Australiana das linhagens: Linhagem *Nousia* (*Nousia*, *Koornonga*, *Neozephlebia* e *Zephlebia*), Linhagem *Dactylophlebia* (*Austroclima*), Linhagem *Penephlebia* (*Penaphlebia*) e Linhagem *Meridialaris* (*Deleatidium*).

O clado VI.3, foi recuperado por representantes da Neotropical (Escudo da Patagônia) e Australiana das linhagens: Linhagem *Hapsiphlebia* (*Atalophlebia* Eaton, 1881 e *Atalomicria* Harker, 1954) e Linhagem *Meridialaris* (*Meridialaris* Peters & Edmunds, 1972, *Massartelopsis* Demoulin, 1955 e *Austrophlebioides* Campbell e Suter, 1988).

Os gêneros *Massartella* (Linhagem *Penaphlebia*) com distribuição na Região Neotropical, e *Jappa* Harker, 1954 (Linhagem *Hapsiphlebia*) com distribuição na Região Australiana, foram recuperados como grupo irmão do clado VI.2, entretanto tal conformação não foi recuperada com suporte estatístico em nenhuma das análises.

Diante do exposto, propomos que os clados VI.2 e VI.3 sejam tratados como as tribos *Deleatidiumini* e *Atalophlebiini*, respectivamente.

4.9 Escudo Guiana e Brasil (EGB)

Enquanto o Escudo da Patagônia mostra uma evolução de intenso intercambio entre as regiões gondwanicas, propõe-se que o EGB evoluiu de forma isolada (Savage, 1987). Como demonstrado em parágrafos anteriores, o EGB foi proposto como monofilético, com linhagens monofileticas. Dominguez (2009), ao investigar a sistemática dos gêneros neotropicais sem asa posterior, apresentou uma filogenia, baseada em dados morfológicos, bem amostrada da região. Entretanto o autor não recuperou o escudo como monofilético. No presente estudo, recuperamos o EGB em dois clados, sendo eles: Terpidinae (**Figura 3.1**, Clado IV), o qual já foi discutido em seção anterior; e o clado VII (**Figura 3.5**), o qual será discutido a seguir.

4.10 Hagenullinae

Propomos que o clado VII (**Figura 3.5**), o qual representa a tribo Hagenulini (Hagenulus/fg1) proposto por Kluge (2008), seja elevado a subfamília: Hagenullinae. De forma geral encontramos os mesmos cinco grandes grupos propostos por Kluge (2008) em Hagenullinae, entretanto o autor não propôs o relacionamento entre eles. Nossos dados apresentaram a relação entre esses grupos e mostram que fazem parte de dois clados principais (VII.1 e VII.2), os quais propomos como uma tribo cada um.

4.10.1 Hagenullini

O clado VII.1 (**Figura 3.5**), propomos ser uma tribo: Hagenullini, foi recuperado por dois complexos, sendo eles: complexo Ulmeritus/Ulmeritoides (clado VII.1.1), a partir de agora denominado subtribo Ulmeritina, e complexo Hagenulus (VII.1.2), proposto por Kluge (2008) como Hagenulus/fg2, a partir de agora denominado subtribo Hagenulina, com a adição do gênero *Ecuaphlebia* Domínguez, 1988 em sua conformação. O clado Ulmeritina + Hagenulina nunca havia sido proposto na literatura, e foram recuperadas com forte suporte estatístico em ambas as análises.

Domínguez (1988) na descrição de *Ecuaphlebia* sugeriu que o gênero relaciona-se mais com *Hagenulopsis* do que com qualquer outro gênero descrito e compartilham

diversos caracteres morfológicos. O autor não apresentou quais caracteres eles compartilham, mas indicou como diferencia-los. Entretanto Domínguez (2009) não recuperou tal relação na filogenia que propôs com base em dados morfológicos. Assim, as relações encontradas no presente estudo corroboram com o relacionamento entre *Ecuaphlebia* e *Hagenulopsis*, como propôs Domínguez (1988), e a sua inserção em Hagenulina. Tais evidências enfatizam a importância da utilização de dados moleculares como uma linha alternativa para auxiliar na distinção entre sinapomorfias e homoplasias como propôs Scotland *et al.* (2003).

4.10.2 Thraulodini

Propomos que o clado VII.2 (**Figura 3.5**) seja uma nova tribo denominada Thraulodini, dentro da qual recuperamos três clados principais (VII.2.1 VII.2.2, e VII.2.3). Esse clado é representado pelos demais gêneros do Escudo Guiana e Brasil, contemplando os complexos: Miroculis, Homothraulus, Perissophlebiodes e Hermanella.

O complexo Miroculis (clado VII.2.2) representa o grupo Miroculis/g1 de Kluge (2008), agora denominado subtribo Miroculina, foi recuperado com forte suporte na análise de ML (BT=81) e moderado na IB (PP=0.85). O gênero *Thraulodes* Eaton, 1884 (clado VII.2.1) foi recuperado como grupo irmão de Miroculina, entretanto tal agrupamento não ofereceu suporte estatístico. Ainda não existe um consenso sobre o posicionamento filogenético de *Thraulodes*. Nossos dados mostraram o gênero como pertencente Thraulodini, semelhante ao que propôs Kluge (2008) ao aloca-lo em Hagenulus/fg1 baseando-se em dados morfológicos. Entretanto Dominguez (2009), em sua filogenia baseada em dados morfológicos, recuperou o gênero como irmão de *Meridialaris*, gênero pertencente ao EP. Diante do exposto, propomos que o gênero seja inserido em uma nova subtribo: Thraulodina.

4.10.3 Hermanellina

O clado VII.2.3 foi recuperado por representantes dos complexos Homothraulus, Perissophlebiodes e Hermanella. Mesmo grupo foi recuperado no “clado O” por Domínguez (2009). Kluge (2008) estabeleceu a subtribo Hermanellina, a qual possui a mesma conformação do clado VII.2.3, exceto por não incluir *Perissophlebiodes* Savage, 1983 no grupo. Propomos que o gênero *Perissophlebiodes* seja adicionado

à subtribo. Apesar de terem sido agrupados em Hermanellina, nossos dados não permitem concluir se os complexos citados são monofiléticos, pois recuperamos uma politomia nessa posição da árvore (**Figura 3.5**).

Para o complexo Hermanella, o mais diverso entre todos os complexos, tanto a relação entre os seus membros, quanto à atribuição correta de algumas espécies, e até mesmo o status supra-específico de alguns táxons ainda são conflituosos (Sartori, 2005; Kluge, 2008). Assim como proposto por Sartori (2005), em nossas análises (**Figura 3.5**), por exemplo, o gênero *Hydrosmilodon* foi recuperado como polifilético. Já *Hylister obliquus* foi recuperado junto com Hermanella. Na análise de Máxima Verossimilhança *Hylister obliquus* é grupo irmão de *Hermanella*, entretanto tal topologia não tem suporte na análise Bayesiana, visto que as três espécies (Duas de *Hermanella* e uma de *Hylister*) formam uma politomia. Nesse sentido o status taxonômico dos gêneros citados continua duvidoso. Kluge (2008) considerou que a instabilidade das espécies dentro do complexo Hermanella seja um reflexo da classificação atual (Flowers e Domínguez, 1991; Sartori 2005), e por isso considerou o complexo como um único gênero *Hermanella*, dividido em cinco subgêneros: *Hermanella*, *Needhamella*, *Leentvaaria*, *Traverella* e *Hylister* (*Hydrosmilodon* e *Paramaka* foram considerados sinônimos juniores de *Needhamella*). Apesar de supostamente fazer parte do complexo Hermanella, não recuperamos o gênero *Hydromastodon* Polegatto & Batista, 2007 junto com os demais gêneros do complexo, entretanto, como temos uma politomia nessa região da árvore (**Figura 3.5**), não podemos confirmar se o gênero faz ou não parte do complexo. Outro resultado interessante foi o gênero *Perissophlebiodes* ter sido recuperado como grupo irmão do complexo Hermanella (sem *Hydromastodon*). Tal associação direta nunca tinha sido proposta na literatura. Entretanto mais esforços devem ser concentrados para compreender melhor a relação interna de Hermanellina.

4.10.4 Perda da asa posterior

Assim como proposto por Domínguez (2009), encontramos em nossos dados que os gêneros neotropicais sem asa posterior não formam um grupo monofilético (**Apêndice 4**).

Recuperamos o gênero *Perissophlebiodes* na subtribo Hermanellina, clado VII.2.3 (**Figura 3.5** e **Apêndice 4**), assim como propôs Domínguez (2009). *Bessierus* Thomas & Orth, 2000, não amostrado, é relacionado à *Perissophlebiodes* e também não possui a asa posterior (Domínguez, 2009). Por serem os únicos gêneros dentro de Hermanellina sem a asa posterior, propomos que o ancestral do grupo possuía o caráter, e a perda ocorreu no ancestral de *Bessierus* + *Perissophlebiodes*.

Os outros gêneros, *Hagenulopsis* e *Askola*, foram recuperados na subtribo Hagenulina, mais proximamente relacionados à Ulmeritina no clado VII.1 (**Figura 3.5** e **Apêndice 4**Apêndice 1), na tribo Hagenulini. O relacionamento entre os gêneros já havia sido proposto (Domínguez, 2009), entretanto é a primeira vez que o posicionamento filogenético do clado é apresentado. Outros gêneros que não foram amostrados e que possuem asa posterior fazem parte de Hagenulina, assim como *Ecuaphlebia*. Como não recuperamos a relação direta entre *Hagenulopsis* e *Askola*, e sim *Askola* + (*Hagenulopsis* + *Ecuaphlebia*), a perda da asa posterior nesses dois gêneros, podem ter sido de forma independente. Entretanto tal relacionamento, apesar de aparecer em ambas às análises, não apresentou suporte estatístico (BT=54, PP=0.68). Sendo assim a inclusão dos outros táxons de Hagenulina é necessária para compreender melhor a evolução do caráter no grupo. Nossos resultados, como previamente proposto por Domínguez (2009), permitem-nos concluir que a perda da asa posterior dos leptophlebiídeos neotropicais ocorreu ao menos duas vezes.

As alterações feitas na classificação de Leptophlebiidae através do tempo, incluindo as que propomos, encontram-se no Apêndice 3. Enquanto que os cladogramas com a nova proposta para Leptophlebiidae encontram-se nos Apêndices: **Apêndice 5**, **Apêndice 6** e **Apêndice 7**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barber-James, H.; Sartori, M.; Gattolliat, J.L. & Webb, J. (2013) World checklist of freshwater Ephemeroptera species. World Wide Web electronic publication. Available online at <http://fada.biodiversity.be/group/show/35> [02/18/2017].
- [2] Holt, B.G.; Lessard, J.P.; Borregaard, M.K.; Fritz, S.A; Araújo, M.B.; Dimitrov, D; Fabre, P.H.; Graham, C.H.; Graves, G.R.; Knud A. Jønsson, K.A.; Nogués-Bravo, D.; Wang, Z.; Whittaker, R.J.; Fjeldså, J. & Rahbek, C. (2013) An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. *Science*, 339 (6115): 74-78, published online 20 December 2012 (10.1126/science.1228282).
- [3] Domínguez, E. (1988) Ecuaphlebia: A new genus of Atalophlebiinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from Ecuador. *Aquatic Insects*, 10(4): 227–235.
- [4] Domínguez, E. (1999) Systematics, cladistics and biogeography of the American genus Farrodes (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 126: 155–189.
- [5] Domínguez, E. (1995) Description of a new subgenus and a new species of Traverella Edmunds, with comments on its phylogeny and biology. In: Corkum, LD; Ciborowski, JJH (Eds.). *Current Directions in Research on Ephemeroptera*. Canadian Scholars Press, Inc. Toronto, 423–431.
- [6] Domínguez, E. (2009) Overview and phylogenetics relationships of the two winged genera of South American Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Aquatic Insects*, 31(1): 63–71.
- [7] Domínguez, E.; Ferreira, M.J. & Nieto, C. (2001) Redescription and Phylogenetic relationships of *Leentvaaria* Demoulin (Ephemeroptera:Leptophlebiidae). *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*, 313-320.

- [8] Domínguez, E.; Molineri, C.; Nieto, C.; Hubbard, M.D.; Pescador, M. & Zúñiga, M.C. (updated 23rd May, 2013). Checklist of South American species of Ephemeroptera.
- [9] Flowers, W.R. (2009) Life was a beach: a panbiogeographic analysis of the cosmopolitan mayfly genus *Choroterpes* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae:Atalophlebiinae). *Aquatic Insects*, 31: 585–593.
- [10] Flowers, R.W. & Domínguez, E. (1991) Preliminary cladistics of the *Hermanella* complex (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae). In: Alba-Tercedor, J.; Sanchez-Ortega A. (Eds). *Overview and Strategies of Ephemeroptera and Plecoptera*. Sandhill Crane Press, Gainesville, 49–62.
- [11] Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 3: 294-297.
- [12] Gatesy, J.; Hayashi, C.; Cronin, A. & Arctander, P. (1996) Evidence from milk casein genes that cetaceans are close relatives of hippopotamid artiodactyls. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 954-963.
- [13] Gillespie, J.; Cannone, J.; Gutell, R. & Cognato, A. (2004) A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from rootworms and related leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae). *Insect Molecular Biology*, 13: 495–518.
- [14] Gillespie, J.J.; Munro, J.B.; Heraty, J.M.; Yoder, M.J.; Owen, A.K. & Carmichael, A.E. (2005) A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 for chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1593–1608.
- [15] Godunko, R.J.; Sroka, P.; Soldán, T. & Bojvoká, J. (2015) The higher phylogeny of Leptophlebiidae (Insecta: Ephemeroptera), with description of a new species of *Calliarcys* Eaton, 1881. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 73 (2): 259-272.
- [16] Gonçalves, I.C.; Da-Silva, E.R. & Takiya, D.M. (2012) A remarkable new genus of Atalophlebiinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from the Neotropics. *Zoologischer Anzeiger*, 251: 131–138.

- [17] Hedges, S.B. & Sibley, C.G. (1994) Molecules vs. morphology in avian evolution: The case of the “pelecaniform” birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 9861-9865.
- [18] Herrington, H. J. (1962) Paleogeographic development of South America. *Bull. Am. Ass. Petr. Geol.*, 46: 1773-1814.
- [19] Hillis, D. & Bull, J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182–192.
- [20] Kluge, N.J. (1994) Habrophlebiinae subfam. n. with description of a new species of Habroleptoides from Caucasus (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). // *Zoosystematica Rossica*, 3 (1): 35–43.
- [21] Kluge, N.J. (2007) A new táxon Hermanellonota, or subtribe Hermanellini subtr.n. (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Hagenulini), with description of three new species from Peruvian Amazonia. *Russian Entomological Journal* 16: 385-400.
- [22] Kluge, N.J. (2008) A new táxon Hermanellonota, or subtribe Hermanellini subtr.n. (Ephemeroptera, Leptophlebiidae, Hagenulini), with description of three new species from Peruvian Amazonia. *Russian Entomological Journal* 16(4): 127–137.
- [23] Kluge, N.J. (2009) Higher system of Atalophlebiinae (Leptophlebiidae) with description of three new species of Terpides s.l. from Peruvian Amazonia. *Russian Entomological Journal*, 18 (4): 243-256.
- [24] Kluge, N.J. (2012) Contribution to the knowledge of Choroterpes (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *Russian Entomological Journal* 21 (3): 273–306.
- [25] Lima, L.R.C.; Nascimento, J.M.C.; Mariano, R.; Pinheiro, U.S.; Salles, F.F. (2012) New species and new records of Hermanella complex (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from Eastern Brazilian Coast. *Annales de Limnologie*, 48:201–213.

- [26] Mariano, R. (2011) A new species of *Paramaka* Savage & Domínguez, 1992 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) from Brazil. *Zootaxa*, 3038: 45–50.
- [27] McCafferty, W.P. & Wang, T.Q. (1994) Phylogenetics and the classification of the *Timpanoga* complex (Ephemeroptera: Ephemerellidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 13: 569–579.
- [28] O'Donnell, B. C. & Jockusch, E. L. (2008), Phylogenetic relationships of leptophlebiid mayflies as inferred by histone H3 and 28S ribosomal DNA. *Systematic Entomology*, 33: 651–667. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.00434.x
- [29] Pescador M.L.& Peters W.L. (1990) Biosystematics of the genus *Massartella* Lestage (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) from South America. *Aquatic Insects*, 12(3): 145–160.
- [30] Pescador, M.L., Hubbard, M.D. & Zuniga, C.M. (2001) The status of the taxonomy of the mayfly (Ephemeroptera) fauna of South America. *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera* (ed. by E. Dominguez), 37–42. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, NY.
- [31] Peters, W.L. (1988) Origins of the North American Ephemeroptera fauna, especially the Leptophlebiidae. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 144:13-24
- [32] Peters, W.L. & Edmunds, G.F. (1964) A revision of the generic classification of the Ethiopian Leptophlebiidae. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 116: 225–253.
- [33] Peters, W.L. & Edmunds, G.F. (1970) Revision of the generic classification of the eastern hemisphere Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Pacific Insects*, 12:157–240.
- [34] Peters, W.L. (1980) Phylogeny of the Leptophlebiidae (Ephemeroptera): an introduction. In: Flannigan JF, Marshall KE. *Advances in Ephemeroptera Biology*. Plenum Press, New York.
- [35] Peters, WL. (1969) *Askola froehlichii*, a new genus and species from southern Brazil (Leptophlebiidae: Ephemeroptera). *Florida Entomologist*, 52:253–258.

- [36] Posada, D. (2008) ModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- [37] Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Xie, D. & Drummond, A.J. (2014) Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- [38] Salles, F.F.; Da-Silva, E.R.; Hubbard, M.D. & Serrão, J.E. (2004) As espécies de Ephemeroptera (Insecta) registradas para o Brasil. *Biota Neotropica*, 4(2):1-34.
- [39] Salles, F.F. & Domínguez, E. (2012) Systematics and Phylogeny of Ulmeritus-Ulmeritoides revisited (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Zootaxa*, 3571: 49-65.
- [40] Sartori, M. (2005) A new species of the genus Paramaka Savage & Domínguez, 1992 with some comments on related genera (Ephemeroptera, Leptophlebiidae, Atalophlebiinae). *Studies on Neotropical Fauna & Environment*, 40(3): 237–245.
- [41] Savage, H.M. (1986) Systematics of the Terpides lineage from the Neotropics: Definition of the Terpides lineage, methods, and revision of Fittkaulus Savage & Peters. *Spixiana*, 9: 255–270.
- [42] Savage, H.M. (1982) A curious new genus and species of Atalophlebiinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from the southern coastal mountains of Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 17: 209–217.
- [43] Savage, H.M. (1983) Wing evolution within Miroculis and related genera (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from northern South America. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 21(2):124–142.
- [44] Savage, H.M. (1987) Biogeographic classification of the neotropical Leptophlebiidae (Ephemeroptera) based upon geological centres of ancestral origin and ecology. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 22(4) 199–222.
- [45] Savage, H.M.; Flowers, R.W. & Porras, V.W. (2005) Rediscovery of *Choroterpes atramentum* in Costa Rica, type species of *Tikuna* new genus (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae), and its role in the "Great American Interchange". *Zootaxa*, 932: 1–14.
- [46] Scotland, R.W.; Olmstead, R.G. & Bennett, J.R. (2003) Phylogeny reconstruction: The role of morphology. *Systematic Biology*, 52: 539-548.

- [47] Sinitshenkova. N. D. (1989) New Mesozoic mayflies (Ephemeroidea) from Mongolia. *Paleontological Journal*, 23(3):26-37 [M. Clapham/M. Clapham/M. Clapham].
- [48] Sivaramakrishnan, K.G. & Venkataraman, K. (1987) Biosystematic studies of South Indian Leptophlebiidae and Heptageniidae in relation to egg ultrastructure and phylogenetic interpretations. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Animal Science)*, 96: 637–646.
- [49] Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312–1313.
- [50] Towns, D.R. & Peters, W.L. (1996) *Fauna of New Zealand: Leptophlebiidae* (Insecta: Ephemeroptera), 36th edn. Manaaki Whenua Press, Lincoln, Canterbury, New Zealand.
- [51] Wang, T.Q. & McCafferty, W.P. (1996) Redescription and reclassification of the South American mayfly *Melanemerella brasiliensis* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Entomological News*, 107: 99–103.
- [52] Wang, T.Q.W.; McCafferty, P. & Edmunds, G.F. (1995) Larva and adult of *Telaganella* (Ephemeroptera: Pannota) and assessment of familial classification. *Annals of the Entomological Society of America*, 88: 324–327.
- [53] Xia, X.; Xie, Z.; Salemi, M.; Chen, L. & Wang, Y. (2003) An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 1-7.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Espécimes de Leptophlebiidae utilizados no presente estudo.

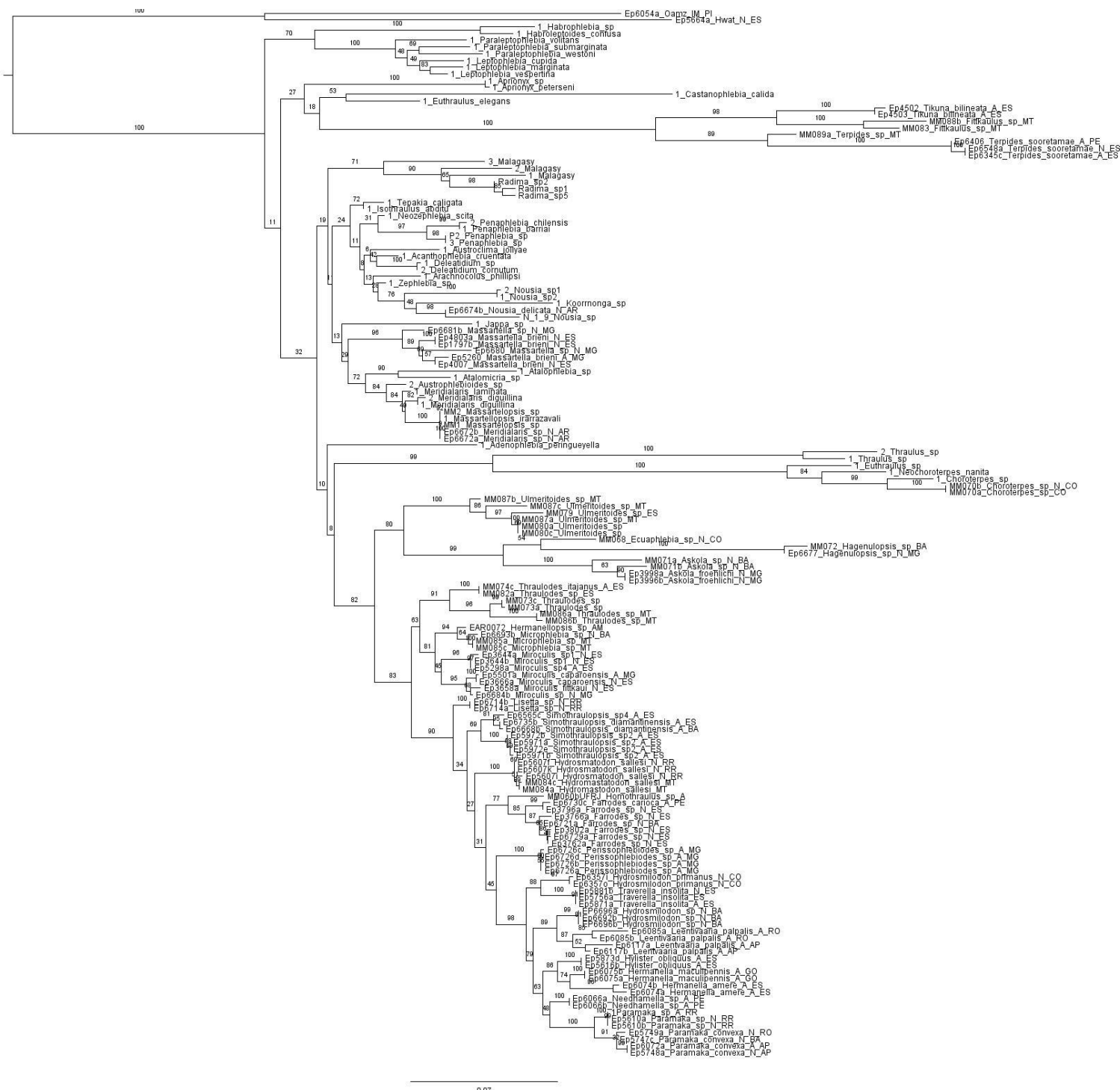
Gênero	Espécie	Nome Árvore	Fonte	País	COI	28S
<i>Acanthophlebia</i>	<i>cruentata</i>	1_A_cruentata	GenBank	Austrália	n	EU874479.1
<i>Adenophlebia</i>	<i>peringueyella</i>	1_A_peringueyella	GenBank		n	AY749968.1
<i>Aprionyx</i>	<i>sp.</i>	1_Aprionyx_sp	GenBank	África do Sul	n	EU874480.1
<i>Aprionyx</i>	<i>peterseni</i>	1_A_peterseni	GenBank	África do Sul	n	EU874481.1
<i>Arachnocolus</i>	<i>phillipsi</i>	1_As_phillipsi	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874482.1
<i>Askola</i>	<i>froehlichii</i>		Ep3996b	Brasil	X	X
<i>Askola</i>	<i>froehlichii</i>		Ep3998a	Brasil	X	X
<i>Askola</i>	<i>sp.</i>		MM071 a	Brasil	X	X
<i>Askola</i>	<i>sp.</i>		MM071 b	Brasil	X	X
<i>Atalomicria</i>	<i>sp.</i>	1_Atalomicria_sp	GenBank	Austrália	n	EU874483.1
<i>Atalophlebia</i>	<i>sp.</i>	1_Atalophlebia_sp	GenBank	Austrália	KP697596	EU874484.1
<i>Austroclima</i>	<i>jollyae</i>	1_Austroclima_jollyae	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874485.1
<i>Austrophlebioides</i>	<i>sp.</i>	2_Austrophlebioides_sp	GenBank	Austrália	n	EU874486.1
<i>Castanophlebia</i>	<i>calida</i>	1_C_calida	GenBank	África do Sul	n	EU874527.1
<i>Chorotherpes</i>	<i>sp.</i>		MM070 a	Colômbia	n	X
<i>Chorotherpes</i>	<i>sp.</i>		MM070 b	Colômbia	X	X
<i>Chorotherpes</i>	<i>basalis</i>	1_Chorotherpes_sp	GenBank	USA	HQ568788	EU874522.1
<i>Deleatidium</i>	<i>sp.</i>	1_Deleatidium_sp	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874487.1
<i>Deleatidium</i>	<i>cornutum</i>	2_D_cornutum	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874488.1
<i>Ecuaphlebia</i>	<i>sp.</i>		MM068	Colômbia	X	X
<i>Euthraulus</i>	<i>elegans</i>	1_Euthraulus_elegans	GenBank	África do Sul	n	EU874528.1
<i>Euthraulus</i>	<i>sp.</i>	1_Euthraulus_sp	GenBank	Malásia	n	EU874521.1
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep 3766 a	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>sp.</i>		Ep6721 a	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep3762 a	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep 3796 a	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep6730 c	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep6729 a	Brasil	X	X
<i>Farrodes</i>	<i>carioca</i>		Ep3802 a	Brasil	X	X
<i>Fittkaulus</i>	<i>sp.</i>		MM083	Brasil	X	X
<i>Fittkaulus</i>	<i>sp.</i>		MM088 b	Brasil	X	X
<i>Gen. Ind. 1</i>	<i>sp.</i>		MM060bUFRJ	Brasil	X	X
<i>Gen. Ind. 2</i>	<i>sp.</i>		Ep6714 b	Brasil	X	X
<i>Gen. Ind. 2</i>	<i>sp.</i>		Ep6714 a	Brasil	X	X
<i>Habroleptoides</i>	<i>confusa</i>	1_H_confusa	GenBank		HG935080	GQ118304.1

<i>Habrophlebia</i>	sp.	1_Habrophlebia_sp	GenBank	Suíça	HG935080	EU874519.1
<i>Hagenulopsis</i>	sp.		Ep6677	Brasil	X	X
<i>Hagenulopsis</i>	sp.		MM072	Brasil	n	X
<i>Hermanella</i>	amere		Ep6074b	Brasil	X	X
<i>Hermanella</i>	angelis/maculipennis		Ep6075b	Brasil	X	X
<i>Hermanella</i>	amere		Ep6074a	Brasil	X	X
<i>Hermanella</i>	angelis/maculipennis		Ep6075a	Brasil	X	X
<i>Hermanellopsis</i>	sp.		EAR0072	Brasil	X	X
<i>Homoeoneuria</i>	watu	Ep5664a_Hwat_N_ES	Ep5664a	Brasil	X	X
<i>Hydromastodon</i>	sallesi		Ep5607i	Brasil	X	X
<i>Hydromastodon</i>	sallesi		Ep5607k	Brasil	X	X
<i>Hydromastodon</i>	sallesi		Ep5607f	Brasil	X	X
<i>Hydromastodon</i>	sallesi		MM084 a	Brasil	X	X
<i>Hydromastodon</i>	sallesi		MM084 c	Brasil	X	X
<i>Hydrosmilodon</i>	sp.		Ep6696 a	Brasil	X	X
<i>Hydrosmilodon</i>	primanus		Ep6357o	Colombia	X	X
<i>Hydrosmilodon</i>	primanus		Ep6357i	Colombia	X	X
<i>Hydrosmilodon</i>	sp.		Ep6696 b	Brasil	X	X
<i>Hydrosmilodon</i>	sp.		Ep6692 b	Brasil	X	X
<i>Hylister</i>	hermanella/obliquus		Ep5873d	Brasil	X	X
<i>Hylister</i>	hermanella/obliquus		Ep5616b	Brasil	X	X
<i>Isothraulius</i>	abditus	1_I_abditus	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874489.1
<i>Jappa</i>	sp.	1_Jappa_sp	GenBank	Austrália	KP697520	EU874490.1
<i>Koornonga</i>	sp.	1_Koornonga_sp	GenBank	Austrália	n	EU874491.1
<i>Leentvaaria</i>	palpalis		Ep6085a	Brasil	X	X
<i>Leentvaaria</i>	palpalis		Ep6117b	Brasil	X	X
<i>Leentvaaria</i>	palpalis		Ep6117a	Brasil	X	X
<i>Leentvaaria</i>	palpalis		Ep6085b	Brasil	X	X
<i>Leptophlebia</i>	cupida	1_L_cupida	GenBank	USA	GU713796	EU874505.1
<i>Leptophlebia</i>	vespertina	1_L_vespertina	GenBank	Noruega	JN299152	EU874508.1
<i>Leptophlebia</i>	marginata	1_L_marginata	GenBank	Noruega	KC158568	EU874509.1
<i>Malagasy 15</i>		3_Malagasy	GenBank	Madagascar	n	EU874470.1
<i>Malagasy 4</i>		2_Malagasy	GenBank	Madagascar	n	EU874474.1
<i>Malagasy 6</i>		1_Malagasy	GenBank	Madagascar	n	EU874476.1
<i>Massartella</i>	sp.		Ep6681 b	Brasil	X	X
<i>Massartella</i>	brieni		Ep 4007	Brasil	X	X
<i>Massartella</i>	brieni		Ep 5260	Brasil	X	X
<i>Massartella</i>	brieni		Ep 1797 b	Brasil	X	X
<i>Massartella</i>	brieni		Ep 4803 a	Brasil	X	X
<i>Massartella</i>	sp.		Ep6680	Brasil	X	X
<i>Massartellopsi</i>	irarrazavali	1_M_irarrazavali	GenBank	Chile	n	EU874492.1
<i>Massartellopsis</i>	sp.		MM1	Argentina	X	X
<i>Massartellopsis</i>	sp.		MM2	Argentina	X	X
<i>Meridialaris</i>	sp.		Ep6672 a	Argentina	X	X
<i>Meridialaris</i>	sp.		Ep6672 b	Argentina	X	X
<i>Meridialaris</i>	laminata	1_M_laminata	GenBank	Chile	n	EU874494.1

<i>Meridialaris</i>	<i>diguillina</i>	1_M_diguillina	GenBank	Chile	n	EU874493.1
<i>Meridialaris</i>	<i>diguillina</i>	2_M_diguillina	GenBank	Chile	n	AY749952.1
<i>Microphlebia</i>	<i>sp.</i>		Ep6693 b	Brasil	X	X
<i>Microphlebia</i>	<i>sp.</i>		MM085 a	Brasil	X	X
<i>Microphlebia</i>	<i>sp.</i>		MM085 c	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>sp.1</i>		Ep3644a	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>sp.1</i>		Ep3644b	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>sp.4</i>		Ep5298a	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>fittkau</i>		Ep3658a	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>caparoensis</i>		Ep5501a	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>caparoensis</i>		Ep3666a	Brasil	X	X
<i>Miroculis</i>	<i>sp.</i>		Ep6679 b	Brasil	X	X
<i>Needhamella</i>	<i>sp.</i>		Ep6066a	Brasil	X	X
<i>Needhamella</i>	<i>sp.</i>		Ep6066b	Brasil	X	X
<i>Neochoroterpes</i>	<i>nanita</i>	1_N_nanita	GenBank	USA	n	EU874524.1
<i>Neozephlebia</i>	<i>scita</i>	1_N_scita	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874495.1
<i>Nousia</i>	<i>delicata</i>		Ep6674 b	Argentina	X	X
<i>Nousia</i>	<i>sp.</i>		N1	Argentina	n	X
<i>Nousia</i>	<i>sp.2</i>	1_Nousia_sp2	GenBank	Austrália	n	EU874497.1
<i>Nousia</i>	<i>sp.1</i>	2_Nousia_sp1	GenBank	Austrália	n	EU874498.1
<i>Oligoneuria</i>	<i>amazonica</i>	Ep6054a_Oamz_IM_PI	Ep6054a	Brasil	X	X
<i>Paraleptophlebia</i>	<i>volitans</i>	1_P_volitans	GenBank	USA	HQ943470	EU874516.1
<i>Paraleptophlebia</i>	<i>westoni</i>	1_P_westoni	GenBank	Japão	KF563025	EU874517.1
<i>Paraleptophlebia</i>	<i>submarginata</i>	1_P_submarginata	GenBank	Suíça	LN734754	EU874514.1
<i>Paramaka</i>	<i>sp.</i>		Ep5610 a	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>sp.</i>		Ep5610 b	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>convexa</i>		Ep6072a	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>convexa</i>		Ep5748a	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>convexa</i>		Ep5749a	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>convexa</i>		Ep5747c	Brasil	X	X
<i>Paramaka</i>	<i>sp.</i>		1Paramaka	Brasil	X	X
<i>Penaphlebia</i>	<i>sp.</i>		P2	Argentina	n	X
<i>Penaphlebia</i>	<i>barriai</i>	1_P_barriai	GenBank	Chile	n	EU874499.1
<i>Penaphlebia</i>	<i>chilensis</i>	2_Pa_chilensis	GenBank	Chile	n	EU874500.1
<i>Perissophlebiodes</i>	<i>flinti</i>		Ep6726 a	Brasil	X	X
<i>Perissophlebiodes</i>	<i>flinti</i>		Ep6726 b	Brasil	X	X
<i>Perissophlebiodes</i>	<i>flinti</i>		Ep6726 c	Brasil	X	X
<i>Perissophlebiodes</i>	<i>flinti</i>		Ep6726 d	Brasil	X	X
<i>Radima</i>	<i>sp.1</i>	Radima_sp1	GenBank	Madagascar	n	EU874473.1
<i>Radima</i>	<i>sp.2</i>	Radima_sp2	GenBank	Madagascar	n	EU874477.1
<i>Radima</i>	<i>sp.5</i>	Radima_sp5	GenBank	Madagascar	n	EU874466.1
<i>Simothraulopsis</i>	<i>sp.4</i>		Ep6565c	Brasil	X	X
<i>Simothraulopsis</i>	<i>sp.2</i>		Ep5972b	Brasil	X	X
<i>Simothraulopsis</i>			Ep6668 b	Brasil	X	X
<i>Simothraulopsis</i>			Ep6735 b	Brasil	X	X
<i>Simothraulopsis</i>			Ep5972 e	Brasil	X	X

<i>Simothraulopsis</i>			Ep5971 a	Brasil	X	X
<i>Simothraulopsis</i>			Ep5971 b	Brasil	X	X
<i>Tepakia</i>	<i>caligata</i>	1_T_caligata	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874502.1
<i>Terpides</i>	<i>sooretamae</i>		Ep6548a	Brasil	X	X
<i>Terpides</i>	<i>sooretamae</i>		Ep6406	Brasil	X	X
<i>Terpides</i>	<i>sooretamae</i>		Ep6345c	Brasil	X	X
<i>Terpides</i>	<i>sp.</i>		MM089 a	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>sp.</i>		MM073 a	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>sp.</i>		MM073 c	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>itajanus</i>		MM074 c	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>sp.</i>		MM082 a	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>sp.</i>		MM086 a	Brasil	X	X
<i>Thraulodes</i>	<i>sp.</i>		MM086 b	Brasil	X	X
<i>Thraululus</i>	<i>sp.1</i>	2_Thraululus_sp	GenBank	Papua-Nova Guiné	n	EU874468.1
<i>Thraululus</i>	<i>sp.3</i>	1_Thraululus_sp	GenBank	Papua-Nova Guiné	n	EU874464.1
<i>Tikuna</i>	<i>bilineata</i>		Ep4503	Brasil	X	X
<i>Tikuna</i>	<i>bilineata</i>		Ep4502	Brasil	X	X
<i>Traverella</i>	<i>insolita</i>		Ep5881b	Brasil	X	X
<i>Traverella</i>	<i>insolita</i>		Ep5871a	Brasil	X	X
<i>Traverella</i>	<i>insolita</i>		Ep5756a	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM079	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM080 a	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM080 c	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM087 a	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM087 b	Brasil	X	X
<i>Ulmeritoides</i>	<i>sp.</i>		MM087 c	Brasil	X	X
<i>Zephlebia</i>	<i>sp.</i>	1_Zephlebia_sp	GenBank	Nova Zelândia	n	EU874503.1

Apêndice 2 -Inferência filogenética de Máxima Verosimilhança dos genes concatenados (COI+28S, 1625 pb). Os valores de probabilidade *a posteriori* são mostrados acima dos ramos.

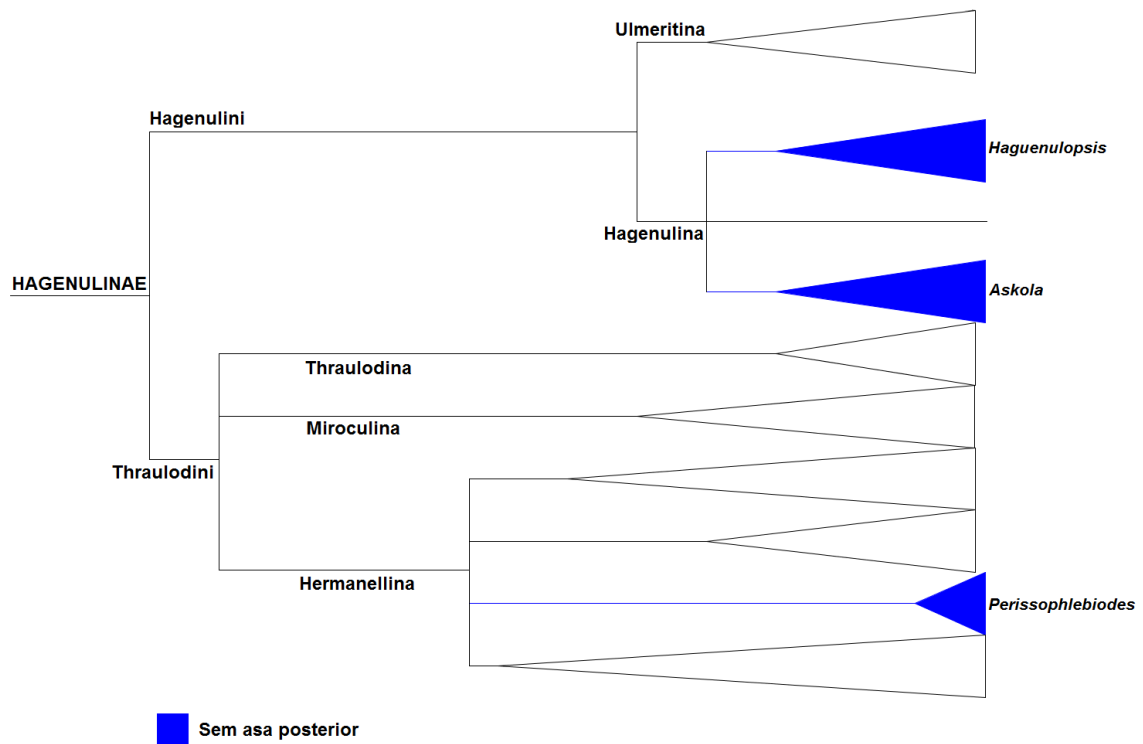


Apêndice 3 - Alterações na classificação de Leptophlebiidae através do tempo incluindo as do presente trabalho.

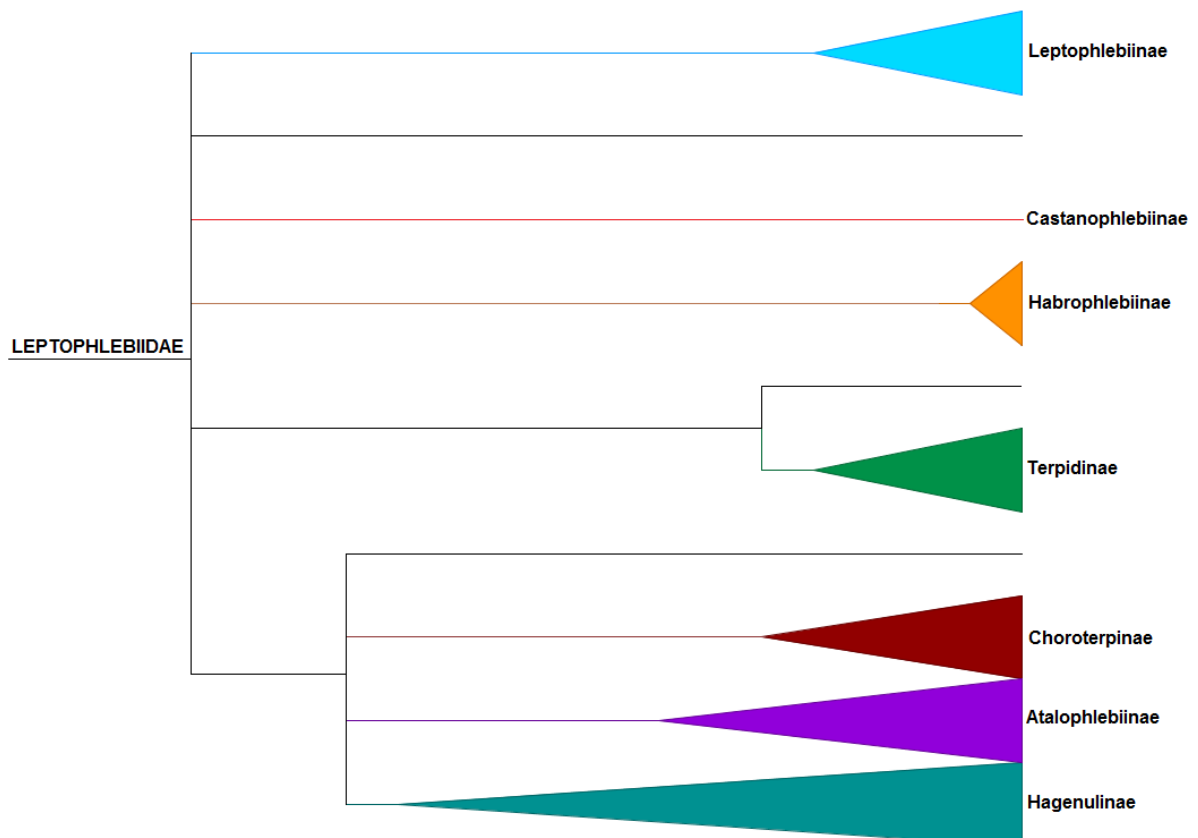
<i>Autor</i>	<i>Banks 1900</i>	<i>Peters 1980</i>	<i>Savage 1980, 1982, 1986 e 1987; Dominguez 1991 e 2009; Flowers e Dominguez 1991; Flowers 2009</i>	<i>Kluge 1994, 2008, 2009, 2012</i>	<i>O'Donnel e Jockusch (2008)</i>	<i>Presente estudo</i>
tipo de dado	Morfológico	Morfológico	Morfológico	Morfológico	Molecular (28s+H3)	Molecular (28s+COI)
Família	Leptophlebiidae	Letophlebiidae	Leptophlebiidae	Leptophlebiidae	Leptophlebiidae	Leptophlebiidae
Subfamília	Leptophlebiinae	Leptophlebiinae Atalophlebiinae	Leptophlebiinae Atalophlebiinae	Leptophlebiinae Habrophlebiinae Atalophlebiinae (Atalophleboling uata) Castanophlebiinae Terpidinae Calliarcinae	Leptophlebiinae Habrophlebiinae Atalophlebiinae	Leptophlebiinae Habrophlebiinae Atalophlebiinae* Castanophlebiinae Terpidinae Choroerterpinae (Choroerterpes/g1) Hagenulinae (Hagenulus/g1)
Tribo¹ Complexo/ Subtribo²			Hapsiphlebia ² Nousia ² Meridialaris ² Dactylophlebia ² Penaphlebia ² Miroculis ² Terpides ² Homothraulius ² Hagenulopsis ² Hermanella ² Ulmeritus/Ulmeritoides ² Perissophlebioides ² Choroerterpes ²	Choroerterpes/g1 ¹ Thraulius/g1 ² Choroerterpes/g2 ² Hagenulus/g1 ¹ Hagenulus/fg2 ² Hermanellina ² Ulmeritus/g1 ² Thraulodes/g1 ² Miroculis/g1 ²	Choroerterpes ² Madagascar ² Paleoaustral ² Thraulodes ²	Thraulini ¹ (=Thraulius/g1) Choroerterpini ¹ (=Choroerterpes/g2) Hagenulini ^{1*} (=Hagenulus/fg2) (=Ulmeritus/g1) Thraulodini ^{1*} Hermanellina ² Thraulodina ² (=Thraulodes/g1) Miroculina ² (=Miroculis/g1) Deleatidiumini ^{1*} Atalophlebinini ^{2*}

*Agrupamento novo.

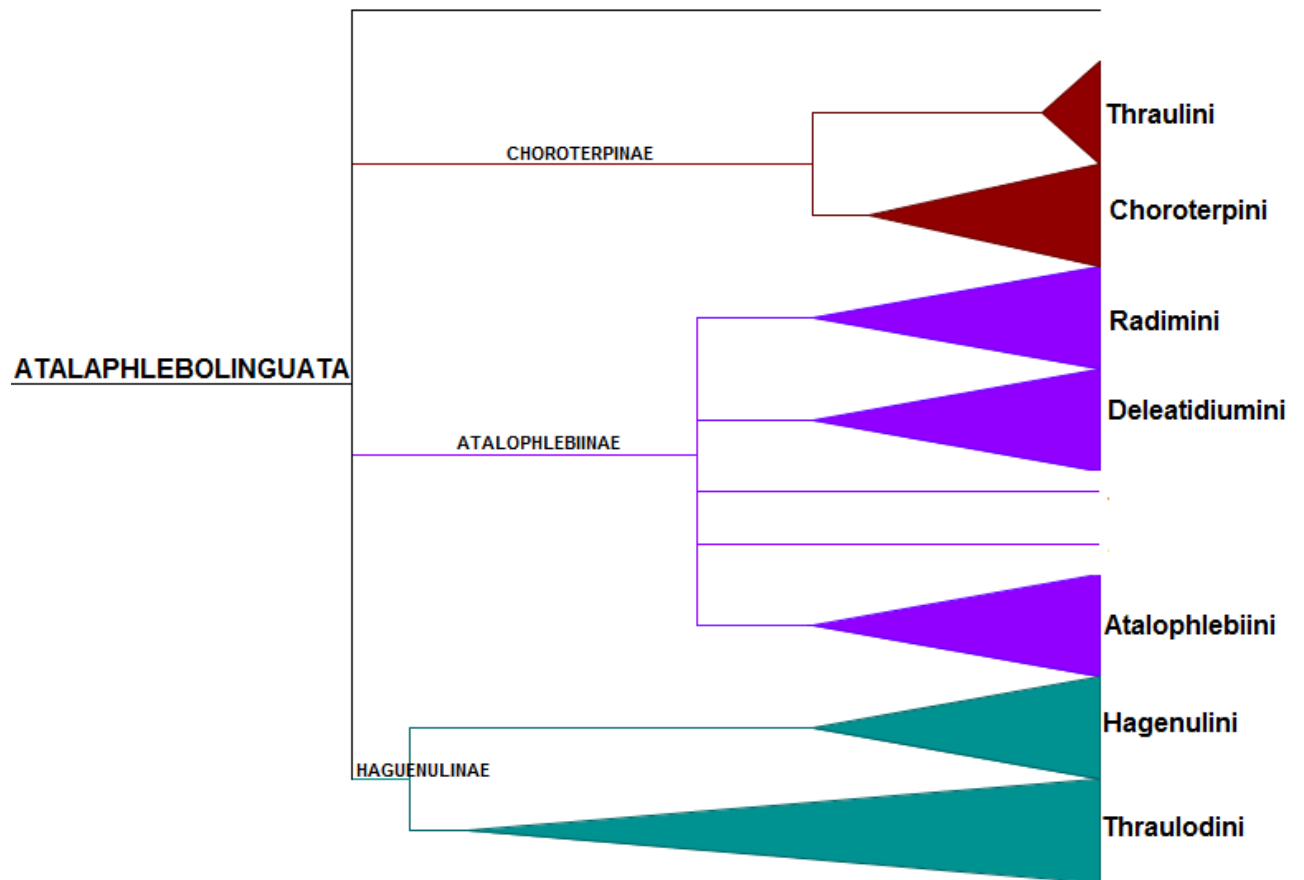
Apêndice 4- Cladograma com evidência nos gêneros sem asa posterior.



Apêndice 5- Cladograma com a classificação proposto para Leptophlebiidae.



Apêndice 6- Cladograma com a classificação proposta para Atalophlebolinguata.



Apêndice 7- Cladograma com a classificação proposta para Haguenulinae.

