

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

**Reconstruindo a história evolutiva de Bethylidae
(Hymenoptera, Chrysidoidea) através de moléculas**

Rosana dos Reis Abrante Nunes

Vitória, ES
Setembro, 2013

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

**Filogenia e diversificação Bethyridae (Hymenoptera,
Chrysidoidea): Reconstruindo a história do grupo através de
moléculas.**

Rosana dos Reis Abrante Nunes

Orientadora: Valéria Fagundes

Co-orientador: Celso Oliveira Azevedo

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Biologia
Animal) da Universidade Federal do Espírito
Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Biologia Animal.**

Vitória, ES

Agosto, 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora. Lembro-me que há 13 anos, muito inexperiente, entrei como aluna de iniciação científica em seu laboratório e aspirava um dia ser como ela. Agora acabando o doutorado e a conhecendo melhor, continuo me inspirando nela como um exemplo do tipo de pesquisadora que um dia deveria me tornar. Agradeço não só pela orientação científica do projeto e o conhecimento compartilhado, mas também pelo exemplo de ética que devemos ter com os colegas pesquisadores, a responsabilidade no cumprimento de projetos e o cuidado com o dinheiro público que recebemos. Sempre pude ter orgulho ao dizer que minha orientadora é Valéria Fagundes.

Ao professor Celso Oliveira Azevedo, pela coorientação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho, agradeço ainda a oportunidade de trabalhar com o grupo totalmente novo e encantador para mim.

A minha mãe por todo sacrifício que foi feito para que eu chegasse até aqui, eu sei que não foi fácil. Vendo todo seu esforço eu percebi o quão importante era estudar para “se ter um futuro ...”

A minha família, minhas irmãs, ao Marlem pela ajuda e apoio, principalmente nessa fase final e conturbada.

Aos amigos do LGA, TODOS que por todo esse tempo passaram pelo laboratório me moldaram. Os alunos do LGA são um tipo à parte, de alguma maneira são especiais e com certeza esses amigos fizeram a tarefa “ir pro lab” muito mais agradável. Os antigos: Roberta Paresque, companheira mais antiga do LGA e amiga para sempre. Cristina Dornelas, amiga e companheira, que para mim na verdade é como uma irmã. Marcela Paes completa o grupo das amigas mais queridas. Os novos: Silva Ramira, Mariana Xavier, Arturo Martinelli, Victor Colombi, Fernanda Zaidan, Lorena Dinelli, Lucas Vianna, Mariana Azevedo, Eduardo Loyola, Marina Monjardim e Yuri Marins. Os mais novos ainda: Gabriel Dalbem, Renan Vasconcelos, Débora Dalvi, Ana Heloísa Carvalho e Thaís Volpi.

A Silvia Ramira, companheira de doutorado, de disciplina, imagina minha vida sem ela para me lembrar de todo relatório de bolsa... Agradeço pelos momentos que passamos juntas, por toda sua ajuda. Agradeço além de tudo sua amizade.

A Arturo Martinelli pelas discussões que tanto enriqueceram o meu trabalho e o nosso laboratório e por toda ajuda com aqueles programas infernais. Só você encontrava os erros nas minhas matrizes que não rodavam de jeito nenhum. Como eu poderia viver sem você?

A Victor Hugo por sempre manter ativa minha paixão pela citogenética, sempre acompanhando o seu trabalho me identificava com sua felicidade ao ver um cariótipo novo e

aquela vontade de resolver todos os problemas citogenéticos do grupo. Agradeço pelas nossas conversas, discussões, nossos momentos café e toda amizade durante esse período.

A todos do Instituto Bethylidae de Sistemática (IBES), pela ajuda imprescindível ao fornecer alguns exemplares e na identificação das amostras e, ainda, a boa vontade de me ajudar no que foi preciso.

A Juliana Justino, por toda a paciência e ajuda no NGACB.

A todos os professores do PPGBAN, por todo o conhecimento e conselhos transmitidos que contribuíram com meu crescimento acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão de bolsa de doutorado e taxa de bancada. Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

*"I shall also attempt to show how the
phytophagous species, under the great law of
evolution, gave place to the parasitic and
predaceous species"*

Ashmead (1896)

RESUMO

Membros de Bethylidae (Chrysidoidea; Apoidea) são vespas parasitóides com um papel ecológico importante por atuar no controle populacional de coleópteros e microlepidópteros. A família possui distribuição mundial e, pelos registros fósseis, começou sua diversificação no Cretáceo Tardio. Sua classificação é controversa e passou por várias mudanças desde sua descrição por Halliday em 1839. Atualmente são reconhecidas cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae e Mesitiinae) e uma subfamília fóssil (Lancepyrinae) alocados em 102 gêneros, sendo 89 viventes. Estudos prévios mostram que marcadores moleculares associados com dados morfológicos auxiliam no entendimento das relações filogenéticas em Hymenoptera e na classificação e criação de hipótese sobre origem e diversificação de clados. O presente trabalho utilizou sequências de dois genes mitocôndrias (subunidade menor 16S do gene ribossomal e citocromo oxidase I) e de um gene nuclear (subunidade maior 28S do gene ribossomal), individualmente ou concatenadas, para inferir as relações entre membros de Bethylidae em diferentes níveis hierárquicos, além de estimar o local e a idade de diversificação das principais linhagens de Bethylidae. A estimativa de tempo de divergência foi utilizada para datar a cladogenese das principais linhagens de Bethylidae. Para a determinação do local de diversificação dessas linhagens foi realizada uma estimativa baseada em eventos históricos de divergência e vicariância. Nossos dados corroboraram a monofilia de Bethylidae e das subfamílias Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae e Mesitiinae, além do agrupamento formado por Scleroderminae + Mesitiinae. O compartilhamento do ancestral comum mais recente entre Bethylidae e Chrysidoidea foi datado em aproximadamente 139 milhões de anos atrás (m.a.a.) e a separação de Bethylidae em duas linhagens principais há aproximadamente 130 m.a.a. Os dados de reconstrução das áreas ancestrais apontam para o surgimento da linhagem que parasita lepidóptera na área que compreendia Austrália e Índia-Madagascar, enquanto a origem da linhagem que parasita coleóptera foi indicada na região sudeste do continente Gondwanico, atualmente correspondente a Índia, Madagascar e Arábia. Dentro de cada subfamília alguns grupos foram destacados como resolvidos taxonomicamente, enquanto que para outros grupos foi evidenciado a necessidade de estudos moleculares e morfológicos mais detalhados para a delimitação taxonômica e elucidação das relações filogenéticas. Em Bethylinae, os gêneros *Lytopsenella* e *Eupsenella* foram recuperados como grupo-irmão e basal aos demais gêneros. *Goniozus* é polifilético e deve representar mais de um gênero. A subdivisão de Pristocerinae em linhagens bem definidas foi congruente com sinapomorfias morfológicas apontadas para o grupo. *Pristocera* foi recuperado como parafilético em relação *Kathepyris*, levantando questões sobre a identidade desses dois gêneros. Epyrinae e Scleroderminae tiveram um histórico taxonômico conturbado, e a filogenia molecular apresentou a necessidade de estudos filogenéticos mais aprofundados. Em Epyrinae,

o gênero *Epyris* foi recuperado como polifilético. Em relação à Scleroderminae, a posição do gênero *Discleroderma* é incerta e os gêneros *Glenossema*, *Tuberepyris* e *Solepyris* foram incluídos em Epyrinae e não em Scleroderminae como preconizam os estudos baseados em morfologia. A subdivisão em tribos de Mesitiinae não foi recuperada, sendo considerado um arranjo artificial. A incorporação da ferramenta molecular trouxe uma nova abordagem nos estudos cladísticos e se mostrou eficiente em recuperar os arranjos propostos cem anos atrás por Kieffer, assim como revelou relações inéditas na literatura. Acreditamos que o panorama atual traz novas perspectivas para estudos cladísticos em Bethylidae, indicando novas abordagens e grupos a serem investigados com estudos morfológicos e moleculares mais robustos e específicos.

ABSTRACT

Bethylidae (Chrysidoidea; Apoidea) are parasitoids wasps that play important ecological roles, such as populational control of beetles and micromoths. This family presents a world wide distribution and according to fossil data its diversification started during the late Cretaceous. The taxonomy of this group is controversial and has been through many modifications since its description by Halliday, in 1839. Currently there are recognized five living subfamilies (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae and Mesitiinae) and one fossil subfamily (Lancepyrinae) placed in 102 genera of which 89 are extant. Previous studies have indicated that the association of molecular markers with morphological data are helpful to understand the phylogenetic relations in Hymenoptera; in elucidating its classification and for the elaboration of hypothesis about the origin and diversification of the clades. In the present work, we used sequences of two mitochondrial genes (small subunit of the ribosomal 16S and cytochrome oxidase subunit I) and one nuclear gene (large subunit of the ribosomal 28S). The sequences were analysed individually or concatenated to infer the relationships within the members of Bethylidae in different hierarchic levels besides estimating the region and age of diversification of the main lineages of the family. Divergence time estimates were used to date the cladogenesis of the main lineages of Bethylidae. In order to determine where the lineages diverged we elaborated an estimative based on historical events of divergence and vicariance. Our data corroborate the monophyly of Bethylidae and of the subfamilies Pristocerinae, Epyrinae and Mesitiinae, besides the group composed of Scleroderminae + Mesitiinae. The sharing of the most recent common ancestor between Bethylidae and Chrysidoidea happened about 139 million years ago and the splitting of Bethylidae into two main lineages took place about 130 million years ago. Data about the reconstruction of the ancestral areas point to the emergence of the lineage that parasites Lepidoptera in the area comprised between Australia and India-Madagascar, while the origin of the lineage that parasites Coleoptera was pointed to the southeastern region of the Gondwana continent, which would correspond today to India, Madagascar and Arabia. Some groups were outlined within each subfamily for not being well resolved taxonomically, while for other groups it was evidenced the need for more detailed molecular and morphological studies to delimit taxonomic units and to elucidate phylogenetic relationships. In Bethylinae the genera *Lytopsenella* and *Eupsenella* were recovered as sister and basal-group of all other genera. *Goniozus* is polyphyletic and should be represented for more than one genus. The subdivision of Pristocerinae into well defined lineages was congruent with morphological synapomorphies of the group. *Pristocera* was recovered as paraphyletic in relation to *Kathepyris*, raising questions about the identity of these two genera. Epyrinae and

Scleroderminae have had a confusing taxonomic history and the molecular phylogeny demonstrated the need for deeper phylogenetic studies. In Epyrinae, *Epyris* was recovered as polyphyletic. In Scleroderminae, the position of *Discleroderma* is uncertain and the genus *Glenossema*, *Tuberepyris* and *Solepyris* were included in Epyrinae and not in Scleroderminae as prescribed in morphology-based studies. The subdivision of Mesitiinae into tribes was not recovered, being considered an artificial cluster. The incorporation of a molecular tool brought new insights in cladistics studies and demonstrated to be efficient in recovering the clusters proposed 100 years ago by Kieffer and additionally revealed unpublished relationships. We believe that the current scenario brings fresh perspectives into cladistics studies, indicating new approaches and groups to be investigated using more robust and specific morphological and molecular approaches.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	8
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Capítulo1:Considerações	
Gerais.....	13
Ordem Hymenoptera.....	14
Parasitoidismo	17
Surgimento de Aculeata	18
Família Bethylidae.....	19
Objetivos do presente estudo.....	21
Referências.....	22
Capítulo 2: Filogenia, diversificação de Bethylidae.....	28
Resumo.....	29
Abstract	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos.....	35
Resultados.....	40
Discussão.....	48
Referências.....	60
Anexo.....	67
Capítulo 3: Relações filogenéticas intergenéricas das subfamílias de Bethylidae.....	74
Resumo.....	75
Abstract	76
Introdução.....	77
Materiais e Métodos.....	79
Resultados.....	83
Discussão.....	100
Referências.....	113

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Considerações Gerais

- Figura 1.1. Sumário das relações filogenéticas a partir de dados morfológicos para níveis hierárquicos superiores de Hymenoptera, modificada de Davis *et al.* (2010), indicando a origem das sinapomorfias de cada agrupamento..... 15
- Figura 1.2. Primeira hipótese filogenética para Hymenoptera proposta por Ashmead (1896).. 17

Capítulo 2: Filogenia e diversificação de Bethylidae

- Figura 2.1. Proposta das relações entre as famílias de Chrysidoidea, baseadas em dados morfológicos, modificada de Hanson & Gauld (1995) e Carpenter (1999)..... 31
- Figura 2.2. Hipóteses filogenéticas disponíveis para a relação entre as subfamílias de Bethylidae. a) Evans (1964); b) Sorg (1988) e Carpenter (1999); c) Terayama (2003a); d) Carr *et al.* (2010) e e) Alencar & Azevedo (2013)..... 34
- Figura 2.3. Hipóteses de filogenia de Bethylidae: A) inferida com o gene COI, B) inferida com o gene 28S e C) inferida com o gene 16S. Estrela indica valores de bootstrap com suporte superior a 95% (IB) e 70% (MV) 43
- Figura 2.4. Filogenia proposta para Bethylidae inferida pela análise combinada dos genes 16S rDNA, COI e 28S rDNA. A árvore mostrada foi derivada da análise de Inferência Bayesiana (4 milhões de gerações). Valores de suporte referentes à probabilidade *a posteriori* indicados acima dos ramos e valores *Bootstrap* (1000 replicações) indicado abaixo dos ramos 44
- Figura 2.5. Frequência nucleotídica (%) de Bethylidae para os três genes analisados evidenciando a tendência de conteúdo alto de A-T nos genes mitocondriais..... 45
- Figura 2.6. Estimativa do centro de origem para os principais clados de Bethylidae, a partir da árvore gerada por inferência bayesiana com gene COI, realizado pelo programa DIVA, sendo as regiões: (A) Etiópica, (B) Neotropical, (C) Australiana, (D) Oriental, (E) Paleártica e (F) Neártica..... 46
- Figura 2.7. Estimativa de tempo de divergência, em milhões de anos atrás, das subfamílias de Bethylidae utilizando relógio relaxado não correlatado e árvore resultante da análise Bayesiana. 48

Capítulo 3: Relações filogenéticas intergenéricas das subfamílias de Bethylidae

- Figura 3.1. Proposta das relações interna de Bethylidae feita por Evans (1964)..... 78
- Figura 3.2. Filogenia de Bethylinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*..... 86
- Figura 3.3. Filogenia de Pristocerinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*..... 89
- Figura 3.4. Filogenia de Epyrinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*..... 95
- Figura 3.5. Filogenia de Mesitiinae e Scleroderminae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*..... 99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Filogenia e diversificação de Bethylidae

Tabela 2.1. Alterações na classificação de Bethylidae através do tempo.....	33
Tabela 2.2. Espécimes de Bethylidae utilizados no presente estudo com destaque nos genes analisados por indivíduos: citocromo oxidase I (COI), RNA ribossomal 16S (16S rRNA) e 28S (28S rRNA).....	36
Tabela 2.3. Sequência de <i>primers</i> usados (direção 5'→3').....	37
Tabela 2.4. Divergência calculada dentro de cada subfamília.....	42
Tabela 2.5. Sinopse da distribuição Zoogeográfica da Família Bethylidae	46
Tabela 2.6. Estimativas de tempo de divergência (milhões de anos atrás) para os nós de Bethylidae. Os valores médios do tempo de divergência foram calculados com dados combinados dos genes COI e 28S, e com os dois genes separados. Os maiores e menores intervalos de confiança são mostrados para a análise com genes 28S e COI concatenados, (95% <i>Upper Highest Posterior Density -UHPD</i> e 95% <i>lower Highest Posterior Density -LHPD</i>).....	47

Capítulo 3: Relações filogenéticas intergenéricas das subfamílias de Bethylidae

Tabela 3.1. Espécimes de Bethylidae utilizados no presente estudo, com destaque nos genes analisados por indivíduos: citocromo oxidase I (COI) e 28S (28S rRNA).....	81
Tabela 3.2. Sequências de <i>primers</i> utilizados.....	82
Tabela 3.3. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (296 pb) entre os gêneros de Bethylinae.....	87
Tabela 3.4. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de 28S (501 pb) entre os gêneros de Bethylinae.....	87
Tabela 3.5. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (251 pb) entre os gêneros de Pristocerinae.....	91
Tabela 3.6. Estimativa de divergência par- a- entre as sequências de 28S (400pb) para Pristocerinae.....	92
Tabela 3.7. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (445pb) entre os gêneros de Epyrinae.....	94
Tabela 3.8 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências 28s (400pb) entre os gêneros de Epyrinae.....	94
Tabela 3.9 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (588) entre os gêneros de Scleroderminae.....	97
Tabela 3.10. Estimativa de divergência par- a- entre as sequências de 28S (400pb) para Scleroderminae.....	97
Tabela 3.11 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (588 pb) entre os gêneros de Mesitiinae.....	98
Tabela 3.12 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de 28S rDNA (501 pb) entre os gêneros de Mesitiinae.....	98

CAPITULO 1
CONSIDERAÇÕES GERAIS

ORDEM HYMENOPTERA

Reconhecida como um dos mais numerosos grupos de insetos, a ordem Hymenoptera possui atualmente mais de 100 mil espécies descritas em 22 superfamílias e é composta por 94 famílias (Davis *et al.*, 2010; Heraty *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que esta ordem compreenda entre 600 mil a 1,2 milhões de espécies (Grimaldi & Engel, 2005), excedendo em número de espécies as ordens Lepidoptera, Diptera e equivalendo a Coleoptera (Gaston, 1991; Hanson & Gauld, 1995). Os himenópteros são muitas vezes divididos em grupos para facilitar a discussão de sua biologia e ecologia. A divisão mais tradicional era feita entre Symphyta e Apocrita (Figura 1.1). Os agrupamentos Symphyta e Apocrita eram considerados subordens de Hymenoptera. Porém, desde o reconhecimento da natureza parafilética de Symphyta (Köningsmann, 1977), o tratamento de subordem é evitado, embora ainda seja tradicionalmente utilizado (Sharkey, 2007).

Os “Symphyta” são caracterizados por serem fitófagos quando larvas e pela ausência da constrição abdominal entre o primeiro e o segundo segmento abdominal (*wasp-waist*). Membros do grupo ocorrem em todos os continentes, com exceção da Antártida e ilhas isoladas como Pacífico e Havaí e é composta por aproximadamente 10 mil espécies (Krombein *et al.*, 1979; Goulet & Huber, 1993). Os membros de Symphyta se alimentam de pólen e folhas, com subsequente transição para tecidos vegetais mortos, com exceção de Orussidae que apresentam hábito parasitóide (Rasnitsyn, 2002; Sharkey, 2007).

O trabalho de Rasnitsyn (1988) foi o ponto inicial do estudo filogenético em Hymenoptera. Ele foi o primeiro a sugerir Symphyta como parafiléticos em relação aos Apocrita, e reconhecer Orussidae como grupo-irmão de Apocrita, implicando em uma única origem para o modo de vida parasitóide. Nesse trabalho, Rasnitsyn (1988) sugeriu a existência do clado Vespina formado por Orussidae+Apocrita. Vários trabalhos posteriores confirmaram a parafilia de Symphyta e a monofilia de Vespina (Rasnitsyn & Zhang, 2010; Ronquist *et al.*, 1999; Schulmeister, 2003a, b; Vilhelmsen, 2006; Vilhelmsen *et al.*, 2010). O recente trabalho com dados moleculares de Heraty *et al.* (2011) dá suporte à monofilia de Vespina e o surgimento único do modo de vida parasitóide.

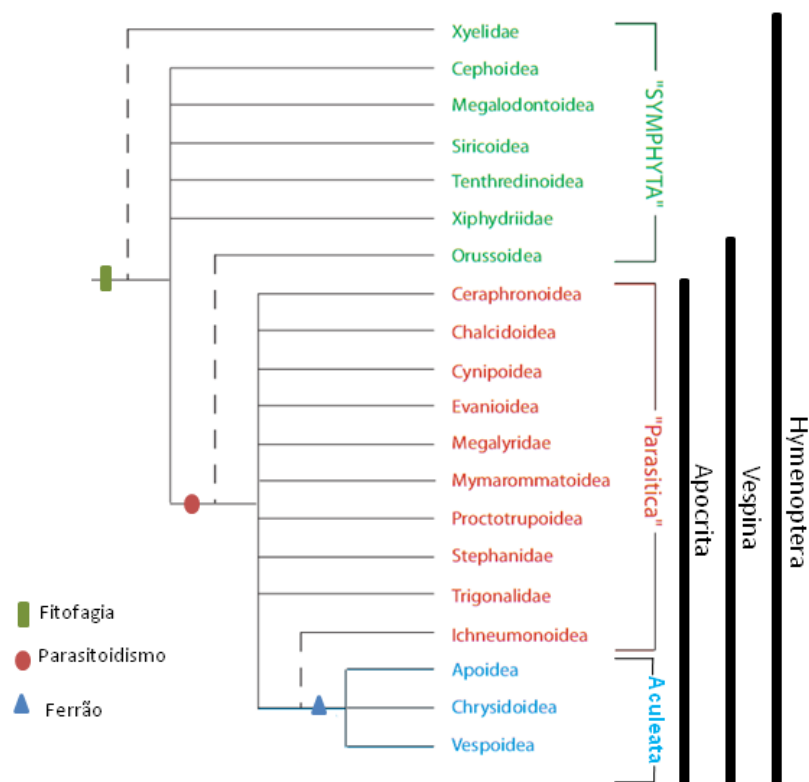


Figura 1.1. Sumário das relações filogenéticas a partir de dados morfológicos para níveis hierárquicos superiores de Hymenoptera, modificada de Davis *et al.* (2010), indicando a origem das sinapomorfias de cada agrupamento.

O agrupamento Apocrita compreende a maioria das espécies descritas de Hymenoptera, cerca de 80 mil (Davis *et al.*, 2010), e é caracterizado pela constrição abdominal formando uma “cintura de vespa” típica e tradicionalmente dividida em dois grupos: Parasitica e Aculeata que se equivalem em números de espécies descritas (Sharkey, 2007). O grupo Parasitica conta com 48 famílias, com ocorrência mundial, distribuídas em 10 superfamílias: Ceraphronoidea, Chalcidoidea, Cynipoidea, Evanioidea, Megalyroidea, Mymarommatoidea, Proctotrupeoidea, Stephanoidea, Trigonalioidea e Ichneumonoidea (Davis *et al.*, 2010; Sharkey, 2007). A maioria das espécies é parasitóide, existindo também espécies fitófagas e predadoras (Gaston, 1991).

O grupo Aculeata possui 28 famílias distribuídas entre três superfamílias: Apoidea (11 famílias), Vespoidea (10 famílias) e Chrysidoidea (sete famílias), seus membros são reconhecidos popularmente por abelhas, formigas e vespas com ferrão (Brady *et al.*, 2009). O grupo é caracterizado pela presença de ferrão nas fêmeas desenvolvido a partir de modificações

do ovipositor. As espécies podem ser predadoras, no caso das vespas, ou alimentam-se de pólen, no caso das abelhas. O parasitoidismo é comum nos Chrysidoidea, considerados o grupo mais basal de Aculeata (LaSalle & Gauld, 1992).

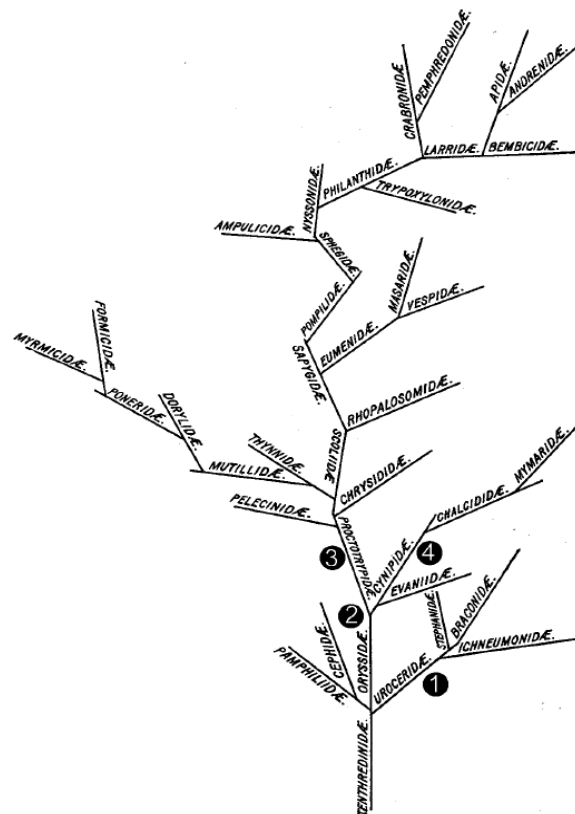
Os himenópteros formam o agrupamento mais diverso biologicamente dentro de Insecta (Gaston, 1991). É o segundo grupo que mais apresenta insetos eusociais; são os principais polinizadores de plantas; e os himenópteros parasitóides, importantes no controle biológico, são insetos chave no ecossistema (La Salle & Gauld, 1993).

Apesar de o entendimento da evolução desses comportamentos complexos dependerem de uma filogenia robusta, as relações filogenéticas entre as superfamílias de Hymenoptera ainda não são compreendidas, principalmente nas diversas linhagens parasíticas, sendo alvo de intensos estudos taxonômicos e filogenéticos (Dowton & Austin, 1994).

Antes de 1970, não era comum a classificação refletir a filogenia, porém as relações dentro de Hymenoptera vêm sendo discutidas há tempo. Ashmead (1896) foi o primeiro a publicar uma filogenia de Hymenoptera, apesar de não terem sido empregados métodos cladísticos (Figura 1.2). Rasnitsyn (1969, 1980, 1988) e Königsmann (1976, 1977, 1978a, b) foram os primeiros a empregar métodos cladísticos para propor hipóteses filogenéticas para Hymenoptera.

Dowton & Austin (1994) realizaram o primeiro trabalho filogenético utilizando dados moleculares de Hymenoptera. Os autores utilizaram a sequência da subunidade 16S do gene ribossomal e muitas relações não puderam ser resolvidas. Mais tarde, Dowton & Austin (2001) fizeram a primeira análise filogenética em Apocrita utilizando vários genes (16S rDNA, 28S rDNA e COI).

Recentemente, Heraty *et al.* (2011) realizaram um trabalho extenso baseado em aproximadamente 7 kilobases de quatro regiões gênicas (18S rDNA, 28S rDNA, COI e EF-1a) representando todas as superfamílias. O trabalho forneceu a primeira evidência molecular para a monofilia de Vespina (Orussoidea+Apocrita) e corroborou a monofilia de Apocrita, mas não conseguiu determinar a posição de Orussidae, podendo estes ser alocados como grupo-irmão de Apocrita ou como grupo-irmão de Stephanidae dentro de Apocrita. Ambos os resultados dão suporte à origem única do parasitoidismo em Hymenoptera, porém o último implica em uma controversa reversão na evolução da constrição no abdome do tipo *wasp-waist*.



Phylogeny of the Hymenoptera.

Figura 1.2. Primeira hipótese filogenética para Hymenoptera proposta por Ashmead (1896, p.328)

PARASITOIDISMO

O parasitoidismo é um mecanismo semelhante ao parasitismo, exceto no fato de o hospedeiro ser morto. Um parasitóide pode ser definido como “um organismo que se desenvolve em um único hospedeiro, extrai nutrientes do mesmo e o mata como resultado direto ou indireto de seu desenvolvimento” (Eggleton & Gaston, 1990).

Em função do local de deposição dos ovos, esses insetos podem ser classificados como endoparasitóides ou ectoparasitóides, quando os ovos são depositados no interior ou sobre os hospedeiros, respectivamente. Os hospedeiros frequentemente são ovos, larvas ou imagos adultos de outros insetos. Essa característica reprodutiva confere aos parasitóides a propriedade de regular as populações de outros insetos, interagindo em vários níveis tróficos, com um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas (Santos & Quicke, 2011). Os parasitóides também podem ser divididos quanto ao modo de ataque ao hospedeiro, sendo considerados idibiontes quando induzem a paralisação do desenvolvimento do hospedeiro, ou cenobiontes, quando permitem a continuação do desenvolvimento do hospedeiro após a postura dos ovos (Pennacchio & Strand, 2006).

Segundo Pennacchio & Strand (2006), insetos parasitóides ocorrem nas ordens Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera sendo mais comum na ordem Hymenoptera, cujas estimativas indicam que as vespas parasitóides podem representar 10 a 20% dos insetos.

De fato, cerca de 75% das espécies de Apocrita são parasitóides de outros insetos durante o período larval. Durante a fase adulta possuem vida livre e se alimentam geralmente de néctar e pólen (Goulet & Huber, 1993). O hábito de vida parasitóide parece ter evoluído apenas uma vez na evolução dos Hymenoptera (Figura 1.1), a partir de um grau basal de famílias fitófagas, surgiu um único clado de Hymenoptera parasita “Vespina” (Heraty *et al.*, 2011).

Acredita-se que essa especialização parasitóide-hospedeiro levou a uma radiação explosiva em “Parasitica” (Heraty *et al.*, 2011). A partir desse comportamento parasitóide, outras formas de comportamentos surgiram em Apocrita, como a predação e o desenvolvimento do socialismo, ocorrendo também reversão a fitófagos comedores de pólen e formadores de galhas (Eggleton e Belshaw, 1992; Heraty, 2009).

Dentro de Aculeata, o socialismo evoluiu independentemente em várias linhagens dentro de Vespoidea e Apoidea, comportamento que evoluiu do hábito de vida parasitóide, mantido em Chrysidoidea, o grupo mais basal dentro de Aculeata.

SURGIMENTO DE ACULEATA

O fóssil mais antigo de Aculeata é datado do Jurássico tardio (~146 m.a.a.) (Rasnitsyn, 2002). Todas as três superfamílias modernas de Aculeata apresentam um extenso registro fóssil no Cretáceo superior. Através de estimativa de divergência com dados moleculares, Brady *et al.* (2009) sugerem que as superfamílias de Aculeata começaram a diversificar no Cretáceo médio, por volta de 170 m.a.a. Dentro de Chrysidoidea, todas as subfamílias apresentam registros fósseis no Cretáceo superior (Engel & Grimaldi 2006; Rasnitsyn 2010; Azevedo & Azar 2012). De acordo com Brothers (2011), é possível supor que as famílias mais basais de Chrysidoidea tiveram uma distribuição Gondwanica, uma vez que as reconstruções paleogeográficas mostram que a América do Sul, Antártica, Austrália e Índia-Madagascar permaneceram ligadas na maior parte do Cretáceo tardio até, pelo menos, 80 m.a.a. (Hay *et al.*, 1999). Para Bethyridae, existem relatos de 45 fósseis descritos, sendo o fóssil mais antigo pertencente à subfamília Lancepyrinae, recentemente descrita por Azevedo & Azar (2012), datando do período Cretáceo Barremiano (~125 m.a.a.). Ainda não foram realizados estudos biogeográficos ou estimativas de tempo de divergência das subfamílias de Bethyridae. Uma vez que se determine o ancestral

comum de um clado e é conhecida sua idade, poderão ser realizadas comparações e inferências sobre a cladogênese e riqueza das espécies. Geralmente, a riqueza de espécie aumenta com o tempo e, assim, a riqueza de um táxon só pode ser identificada como anômala se a sua idade absoluta ou relativa é conhecida.

FAMÍLIA BETHYLIDAE (HYMENOPTERA, CHRYSIDOIDEA)

Chrysidoidea são compostos por aproximadamente de 8.000 espécies (levantamento próprio) e subdividida em sete famílias viventes (Chrysididae, Dryinidae, Embolemidae, Plumariidae, Sclerogibbidae, Scolebythidae e Bethylidae) e uma fóssil (Plumalexiidae), apontada como a mais basal dentro de Chrysidoidea (Brothers, 2011).

A família Bethylidae atualmente é composta por 2481 espécies, amplamente distribuída desde os trópicos até as regiões subárticas do mundo (Terayama, 2003a). A história da taxonomia de Bethylidae remete ao começo do século XIX. Panzer (1801) descreveu *Bethylus hemipterus* (descrito como *Tiphia hemiptera*). Em 1802, Latreille estabeleceu o gênero *Bethylus* baseado na espécie de Panzer. Até 1850 mais cinco gêneros foram descritos: *Pristocera* Klug, 1808; *Sclerodermus* Latreille, 1809; *Epyris* Westwood, 1832; *Cephalonomia* Westwood, 1833 e *Calyoza* Westwood, 1837. A definição desses gêneros foi instável devido à incompletude da classificação de Hymenoptera no nível de família e subfamília durante o século XIX.

O nome Bethylidae foi utilizado pela primeira em 1839 por Halliday. Förster (1856) usou o termo Bethyloidea para o mesmo grupo tratando-os como superfamília. Em 1883 Cameron incorporou a subfamília Bethylinae na família Proctotupoidae. Dalla Torre (1898) dividiu a subfamília de Cameron em duas subfamílias, Bethylinae e Pristocerinae. Ashmead (1902) tratou o grupo novamente como família, voltando a empregar o termo Bethylidae.

A sistemática de Bethylidae é bastante confusa, existindo muita controvérsia sobre o número de subfamílias existentes, bem como as relações entre as subfamílias (Carr *et al.*, 2010), podendo variar de quatro a sete, dependendo da classificação adotada. Terayama (2003b) e Lanes & Azevedo (2008) consideraram sete subfamílias (Bethylinae, Epyrinae, Pristocerinae, Mesitiinae, Protopristocerinae, Galodoxinae e Afgoiogfinae), enquanto trabalhos mais recentes (Alencar & Azevedo, 2013; Azevedo & Azar, 2012) consideraram somente cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae, Pristocerinae e Scleroderminae) e uma fóssil (Lancepyrinae).

O parasitoidismo de Bethylidae acontece principalmente em larvas de Coleoptera e microlepidoptera (Finnamore & Gauld, 1995; Azevedo, 1999). Por matarem seus hospedeiros, que muitas vezes estão associados com plantações humanas, é natural que muitos Bethylidae tenham sido indicados como bons agentes para o controle biológico de pragas (Gordh, 1982, 1984; Legner & Gordh, 1992).

Todo o estudo de sistemática de Bethylidae realizado até 2010 foi baseado em dados morfológicos, com exceção de Carr *et al.*, 2010 que utilizaram dados moleculares para estudar as relações entre as subfamílias. Embora amplamente utilizado, sabe-se que caracteres morfológicos, de modo geral, são passíveis de convergência adaptativa (Scotland *et al.*, 2003), levando à reconstrução de hipóteses evolutivas incorretas (Hedges & Sibley, 1994; Gatesy *et al.*, 1996). Em vespas parasitóides, em especial, é comum encontrar convergência de estruturas entre diferentes espécies, em decorrência da adaptação ao mesmo tipo de hospedeiro ou ambiente (Ronquist, 1994; Quicke *et al.*, 2003). Membros da família Plumariidae possuem morfologia atípica: os machos possuem asas amplas com nervação rica e nervuras acessórias bem desenvolvidas na membrana apical similar a muitos Mutillidae (Vespoidea) e Heterogynidae (Apoidea), o que levou Brothers (1974), equivocadamente, a relacionar esta última com Plumariidae.

Devido ao dimorfismo sexual, muitas vezes se torna difícil a associação de fêmeas. A confusão chega a tal complexidade que a fêmea descrita como *Plumaroides tiphlus* Diez, 2008 (Plumariidae) foi reposicionada por Quintero & Cambra (2010) dentro do gênero *Pseudisobrachium* Kieffer, 1904 (Bethylidae). Frequentes confusões na alocação de espécies, até mesmo no nível de subfamília, mostram a complexidade e a dificuldade de identificação morfológica de alguns exemplares. O gênero de Bethylidae *Foenobethylus* Kieffer, 1913 permaneceu por quase um século classificado como *incertae sedis* (Gordh & Móczár 1990). A fêmea de *Foenobethylus* é desconhecida e, como proposto por Várkonyi & Polaszek (2007), devido ao alto dimorfismo em Pristocerinae é possível que a fêmea já seja conhecida para a ciência sob um nome genérico diferente.

Nos casos de adaptações morfológicas associadas ao nicho que levaram a perdas excessivas de características, principalmente nas espécies de Bethylidae denominadas mirmecófilas, como por exemplo, *Rhabdepyris myrmecophilus* Kieffer, 1904 e espécies de habitat restrito como as fêmeas de Pristocerinae, a confusão na identificação é ainda maior.

Em contraposição, genes não sofrem convergência devido ao modo de vida ou habitat e fornecem um número extremamente maior de caracteres quando comparados com uma matriz de caracteres morfológicos. Muitos arranjos propostos com resoluções limitadas e baseados em dados morfológicos representam um ponto de partida para análises de sequências de DNA

(Scotland *et al.*, 2003). Dados moleculares têm importância inestimável para identificar espécies crípticas (duas ou mais espécies classificadas como uma, por suas semelhanças morfológicas). Em diversos grupos de Hymenoptera (ex. Apidae, Ichneumonidae, Chalcidoidea) foram encontrados complexos de espécies crípticas através do uso de ferramentas moleculares (Carolan *et al.*, 2012; Haine *et al.*, 2006 e Veijalainen *et al.*, 2011)

Apesar das vantagens, a abordagem molecular tem algumas limitações, pois genes diferentes podem gerar sinais filogenéticos conflitantes na mesma análise por razões biológicas e analíticas por motivos como a escolha do critério de otimização, utilização de genes parálogos, saturação mutacional e atração de ramos longos e transferência lateral de genes, entre outros (Hillis & Wiens, 2000; Sota & Vogler, 2001; Taggart *et al.*, 2001; Gribaldo & Philippe, 2002). Consequentemente, nem todas as partes do genoma necessariamente contribuem para a precisão filogenética. Além do exposto acima, dados moleculares não podem ser aplicados em estudos envolvendo organismos fósseis.

A melhor abordagem deve fazer interagir dados morfológicos e moleculares, podendo ser realizada tanto uma análise para identificar os pontos de incongruência entre os conjuntos de dados ou uma análise combinada (Queiroz *et al.*, 1995).

OBJETIVO DO PRESENTE ESTUDO

Considerando algumas questões pendentes de sistemática de Bethylidae, o presente estudo aborda dois tópicos utilizando dados moleculares de genes mitocondriais e nucleares, os quais serão apresentados em dois capítulos, cada qual com o objetivo específico, como se segue:

Capítulo 1. Testar a monofilia das subfamílias de Bethylidae, bem como recuperar as relações hierárquicas entre elas; estimar a idade do surgimento de Bethylidae e o período de diversificação das subfamílias.

Capítulo 2. Avaliar as relações filogenéticas dentro de cada subfamília e verificar a congruência com estudos morfológicos.

REFERÊNCIAS

- Alencar IDCC & Azevedo CO (2013) Reclassification of Epyrini (Hymenoptera: Bethylidae): a tribal approach with commentary on their genera. *Systematic Entomology*, 38: 45-80.
- Ashmead WH (1896) The phylogeny of the Hymenoptera. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 3: 323-336.
- Azevedo CO & Azar D (2012) A new fossil subfamily of Bethylidae (Hymenoptera) from the Early Cretaceous Lebanese amber and its phylogenetic position. *Zoologia*, 29: 210-218.
- Azevedo CO (1999) Bethylidae. Biodiversidade do Estado de São Paulo: *Síntese do conhecimento ao final do século XX* (ed. by Brandão CRF & Cancellato EM), FAPESP, São Paulo, pp. 169-181.
- Brady SG, Larkin L & Danforth BN (2009) Bees, ants, and stinging wasps (Aculeata). *The time tree of life* (ed. by Hedges SB & Kumar S), Oxford University Press, New York, pp. 264-269.
- Brothers JD (1974) The genera of Plumariidae, with description of a new genus and species from Argentina (Hymenoptera: Bethyloidea). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 37: 351-356.
- Brothers JD (2011) A new Late Cretaceous family of Hymenoptera, and phylogeny of the Plumariidae and Chrysidoidea (Aculeata). *ZooKeys*, 130: 515-542.
- Carolan JC, Murray TE, Fitzpatrick Ú, Crossley J, Schmidt H, Cederberg B, McNally L, Paxton RJ, Williams PH, Brown MJF (2012) Colour Patterns Do Not Diagnose Species: Quantitative Evaluation of a DNA Barcoded Cryptic Bumblebee Complex. *PLoS ONE*, 7: e29251.
- Carr M, Young JPW, Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics and Evolution*, 41: 55-73.
- Davis RB, Baldauf SL, Mayhew PJ (2010) The origin of species richness in the Hymenoptera: insights from a family-level supertree. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 109.
- De Queiroz A, Donoghue MJ & Kim J (1995) Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 657-681.

- Dowton M & Austin AD (1994) Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 9911-9915.
- Dowton M & Austin AD (2001) Simultaneous analysis of 16S, 28S, COI and morphology in the Hymenoptera: Apocrita evolutionary transitions among parasitic wasps. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 87-111.
- Eggleton P & Belshaw R (1992) Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences*, 337: 1-20.
- Eggleton P & Gaston KJ (1990) "Parasitoid" species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises. *Oikos*, 59: 417-421.
- Engel MS & Grimaldi DA (2006) The first Cretaceous sclerogibbid wasp (Hymenoptera: Sclerogibbidae). *American Museum Novitates*, 3515: 1-7.
- Finnamore AT & Gauld ID (1995) Bethylidae. *The Hymenoptera of Costa Rica* (ed by Hanson P & Gauld ID), Oxford University Press, Oxford, pp. 470-479.
- Gaston KJ (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, 5: 283-296.
- 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.
- Gordh G & Móczár L (1990) A catalog of the world Bethylidae (Hymenoptera: Aculeata). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 46:1-364.
- Gordh G (1982) A new species of *Goniozus* (Hymenoptera, Bethylidae) imported into California for the biological control of the navel orangeworm (Lepidoptera, Pyralidae). *Entomological News*, 93: 136-138.
- Gordh G (1984) *Goniozus pakmanus* (Hymenoptera, Bethylidae), a new species imported into California for the biological control of pink bollworm (Lepidoptera, Gelechiidae). *Entomological News*, 95: 207-211.
- Goulet H & Huber JT (1993) Hymenoptera of the World: An identification guide to families. *Agriculture Canada Publication* (ed by Goulet H & Huber JT) Centre for Land and Biological Resources Research, Ontario, pp. 688.
- Gribaldo S & Philippe H (2002) Ancient Phylogenetic Relationships. *Theoretical Population Biology*, 61: 391-408.

- Grimaldi D & Engel MS (2005) Evolution of the insects. Cambridge University Press, New York, pp. 755.
- Haine ER, Martin J & Cook M (2006) Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 83.
- Hanson PE & Gauld ID (1995) The Hymenoptera of Costa Rica. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* (ed by Oxford University Press), Berlin, pp. 893.
- Hay WW (and 10 others) (1999) Alternative global Cretaceous paleogeography. *Geological Society of America Special Paper*, 332: 1-48.
- Hedges SB & Sibley CG (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.
- Heraty JM (2009) Parasitoid biodiversity and insect pest management. *Insect Biodiversity: Science and Society* (ed by Footitt B & Adler P) Springer-Verlag Press, Hague, Netherlands, pp. 445-462.
- Heraty JM, Ronquist F, Carpenter JM, Hawaks D, Schulmeister S, Dowling PA, Murray D, Munro J, Wheeler CW, Schiff N & Sharkey M (2011) Evolution of the hymenopteran megadiapause. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 73-88.
- Hillis DM & Wiens JJ (2000) Molecules versus morphology in systematics: Conflicts, artifacts, and misconceptions. *Phylogenetic analysis of morphological data* (ed by Wiens JJ) Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 1-19.
- Königsmann E (1976) Das phylogenetische System der Hymenoptera. Teil 1: Einführung, Grundplanmerkmale, Schwestergruppe und Fossilfunde. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 23: 253-79.
- Königsmann E (1977) Das phylogenetische System der Hymenoptera. Teil 2: Symphyta. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 24: 1-40.
- Königsmann E (1978a) Das phylogenetische System der Hymenoptera. Teil 3: Terebrantes (Unterordnung Apocrita). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 25: 1-55.
- Königsmann E (1978b) Das phylogenetische System der Hymenoptera. Teil 4: Aculeata (Unterordnung Apocrita). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 25: 365-435.
- Krombein KV, Hurd JRPD, Smith DR & Burks D (1979) Catalog of Hymenoptera in America North of Mexico. *Smithsonian Institution Press, Washington*, pp. 2735.
- Lanes GO & Azevedo CO (2008) Phylogeny and taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethyridae, Epyrinae). *Insect Systematic and Evolution*, 39: 55-86.

- LaSalle J & Gauld ID (1992) Parasitic Hymenoptera and the Biodiversity Crisis. *Redia*, 74:315-334.
- LaSalle J & Gauld ID (1993) Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of the others organism. *Hymenoptera and Biodiversity* (ed by Lasalle J & Gauld ID) CAB international, Wallingford, pp. 1-26.
- Legner EF & Gordh G (1992) Lower navel orangeworm (Lepidoptera, Phycitidae) population densities following establishment of *Goniozus legneri* (Hymenoptera, Bethyridae). *California Journal of Economic Entomology*, 85: 2153-2160.
- Pennacchio F & Strand MR (2006) Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review Entomology*, 51: 233-58.
- Quicke DLJ, Laurenne NM & Broad GR (2003) Host location behaviour and a new host record for *Gabunia* aff. *togoensis* Krieger (Hymenoptera: Ichneumonidae: Cryptinae) in Kibale Forest National Park, west Uganda. *African Entomology*, 11: 308-310.
- Quintero AD & Cambra TR (2010) First records of Plumariidae (Hymenoptera) from Paraguay and comments on the females of *Plumaroides tiphilus* Diez and *Plumarius coquimbo* Perez D'Angello. *Entomological News*, 121: 41-44.
- Rasnitsyn AP & Haichun Z (2010) Early evolution of Apocrita (Insecta, Hymenoptera) as indicated by new findings in the Middle Jurassic of Daohugou, Northeast China. *Acta Geologica Sinica*, 84: 834-873.
- Rasnitsyn AP & Zhang H (2010) Early evolution of Apocrita (Insecta, Hymenoptera) as indicated by new findings in the middle Jurassic of Daohuou, northeast China. *Acta Geologica Sinica*, 84: 834-873.
- Rasnitsyn AP (1969) Origin and evolution of the lower Hymenoptera. *Trudy Paleontologicheskii Instituta*, 123:1-196.
- Rasnitsyn AP (1988) An outline of evolution of hymenopterous insects (order Vespida). *Oriental Insects*, 22: 115-145.
- Rasnitsyn AP (2002) Superorder Vespidea Laicharting, 1781. Order Hymenoptera Linn, 1758. *History of Insects* (ed by Rasnitsyn AP & Quicke DLJ) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 242-254.
- Rasnitsyn AP (2010) Molecular phylogenetics, morphological cladistics, and fossil record. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 89: 85-132. In Russian; English translation in *Entomological Review*, 90: 263-298.

- Ronquist F (1994) Evolution of parasitism among closely related species: Phylogenetic relationships and the origin of inquilinism in gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Evolution*, 48: 241-266.
- Ronquist F, Rasnitsyn AP, Roy A, Eriksson K & Lindgren M (1999) Phylogeny of the Hymenoptera: a cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zoologica Scripta*, 28: 13-50.
- Santos AMC & Quicke DLJ (2011) Large-scale diversity patterns of parasitoid insects. *Entomological Science*, 14: 371-382.
- Schulmeister S (2003a) Review of morphological evidence on the phylogeny of basal Hymenoptera (Insecta), with a discussion of the ordering of characters. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 209-243.
- Schulmeister S (2003b) Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 245-275.
- Scotland RW, Olmstead RG & Bennett JR (2003) Phylogeny reconstruction: The role of morphology. *Systematic Biology*, 52: 539-548.
- Sharkey MJ (2007) Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668, 521-548.
- Sota T & Vogler AP (2001) Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*, 50: 39-59.
- Taggart TW, Crother BI & White ME (2001) Palm-pitviper (*Bothriechis*) phylogeny, mtDNA, and consilience. *Cladistics*, 17: 355-370.
- Terayama M (2003a) Phylogeny systematics of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera) Part II. Keys to subfamilies, tribes and genera in the world. *The Academic Reports of the Faculty of Engineering Tokyo Polytechnic University*, 26: 16-29.
- Terayama M (2003b) Phylogenetic systematics of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera) Part I. Higher classification. *The Academic Reports of the Faculty of Engineering of Tokyo Polytechnic University*, 26: 1-15.
- Várkonyi G & Polaszek A (2007) Rediscovery and revision of *Foenobethylus* Kieffer, 1913 (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 1546: 1-14.
- Veijalainen A, Broad GR, Wahlberg N, Longino JT & Sääksjärvi IE (2011) DNA barcoding and morphology reveal two common species in one: *Pimpla molesta* stat. rev. separated from *P. croceipes* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *ZooKeys*, 124: 59-70.

- Vilhelmsen L (2006) Developments in "symphytan" phylogenetics in the 20th century: towards a consensus. *Recent Sawfly Research: Synthesis and Prospects* (Blank S M, Schmidt, S. & Taeger, A) Goecke & Evers, Keltern, pp. 31-38.
- Vilhelmsen L, Mikó I & Krogmann L (2010) Beyond the wasp-waist: structural diversity and phylogenetic significance of the mesosoma in apocritan wasps (Insecta: Hymenoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 159: 22-194.

CAPÍTULO 2

FILOGENIA E DIVERSIFICAÇÃO DE BETHYLIDAE

RESUMO

Bethylidae (Chrysidoidea; Apoidea) são vespas parasitóides com um papel ecológico importante por atuar no controle populacional de coleópteros e microlepidópteros. A família possui distribuição mundial e, pelos registros fósseis, começou sua diversificação no Cretáceo tardio. Sua classificação é controversa e passou por várias mudanças desde sua descrição por Halliday em 1839. A primeira proposta cladística para a família foi apresentada por Kieffer (1914) que propôs a existência de cinco linhagens distintas em Bethylidae, na época classificadas como tribos. Atualmente são reconhecidas cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae e Mesitiinae) e uma subfamília fóssil (Lancepyrinae), alocados em 102 gêneros, sendo 89 viventes. Estudos prévios mostram que marcadores moleculares associados com dados morfológicos auxiliam no entendimento das relações filogenéticas em Hymenoptera, na classificação e na criação de hipótese sobre origem e diversificação de clados. O presente trabalho utilizou sequências de dois genes mitocôndrias (16S rDNA e citocromo oxidase I) e de um nuclear (28S rDNA) e 50 gêneros de Bethylidae representando as cinco subfamílias viventes reconhecidas atualmente com o objetivo de recuperar as relações entre as subfamílias, estimar o tempo de divergência desses táxons através de relógio molecular, reconstruir a biogeografia histórica da família e estimar o local da diversificação das principais linhagens de Bethylidae. Nossos resultados recuperaram a topologia (Bethylinae + (Pristocerinae + (Epyrinae + (Scleroderminae + Mesitiinae)))) e, como previamente proposto por Kieffer cem anos atrás, a existência de cinco linhagens distintas para a família. Nossos dados corroboraram a monofilia de Bethylidae e das subfamílias Bethylinae, Pristocerinae e Epyrinae. Bethylinae é a subfamília mais basal. A separação de Scleroderminae e Epyrinae é confirmada, encerrando definitivamente a proposta do passado de que fossem tribos dentro de Epyrinae. O agrupamento entre Scleroderminae e Mesitiinae, já sugerida previamente por dados moleculares, é mantida, levantando questões sobre possíveis sinapomorfias para esse arranjo. O compartilhamento do ancestral comum mais recente entre Bethylidae e Chrysidoidea foi datado em aproximadamente 139 milhões de anos e a separação de Bethylidae em duas linhagens principais foi datada acontecendo há aproximadamente 130 milhões de anos. A linhagem que parasita lepidóptera representada por Bethylinae teve sua origem na área que compreendia Austrália e Índia-Madagascar. A linhagem que parasita coleóptera formada por Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae e Mesitiinae tiveram seu ponto de origem na região sudeste do continente Gondwanico, região que atualmente compreende a Índia, Madagascar e Arábia, congruente com um cenário de diversificação adaptada ao hábito parasítico.

ABSTRACT

Bethylidae (Chrysidoidea; Apoidea) comprises parasitoid wasps that play important ecological roles, such as populational control of beetles and micromoths. This family presents a worldwide distribution and according to fossil data its diversification started during the late Cretaceous. The taxonomy of this group is controversial and has been through many modifications since its description by Halliday, in 1839. Currently there are five recognized living subfamilies (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae and Mesitiinae) and one fossil subfamily (Lancepyrinae) distributed among 102 genera of which 89 are living. Previous studies have suggested that the association of molecular markers with morphological data is helpful for clarifying the phylogenetic relations in Hymenoptera; elucidating its classification and hypothesizing the origin and diversification of the clades. In this work we used sequences of two mitochondrial genes (small subunit 16S of ribosomal DNA and cytochrome oxidase subunit I) and one nuclear gene (large subunit 28S of ribosomal DNA) of 50 Bethylidae genera, representative of the extant families, to understand the relationship among the subfamilies and to estimate the time of divergence using a molecular clock. In order to reconstruct the biogeographic history of Bethylidae we associated phylogenetic and geographic distribution data and estimated the diversification spot of the main lineages of the family. Molecular analysis recovered the following topology: (Bethylinae + (Pristocerinae+ (Epyrinae + (Scleroderminae +Mesitiinae))))), and as previously proposed by Kieffer hundred years ago, the existence of five distinct lineages in the family. Our results corroborated the monophyly of Bethylidae, as well as Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae and Mesitiinae. The separation of Scleroderminae and Epyrinae is confirmed, ending the proposal of the past that they were tribes within Epyrinae. The cluster Scleroderminae and Mesitiinae, already suggested by molecular data, is maintained, raising questions about possible synapomorphies to this arrangement. We estimated the most recent common ancestor between Bethylidae and Chrysidoidea in about 139 million years ago. This indicates the splitting of Bethylidae in two main lineages in a short period estimated at around 130 million years ago. The lepidopteran parasite lineage represented by Bethylinae had its origin in the area that included Australia and India-Madagascar. The Coleoptera parasite lineage formed by Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae and Mesitiinae presented their point of origin in southeastern mainland Gondwanic region, which currently includes India, Madagascar and Arabia, consistent with a scenario of diversification which adapted to the parasitic habit.

INTRODUÇÃO

Bethylidae pertencem à superfamília Chrysidoidea que, juntamente mais seis famílias (Chrysididae, Dryinidae, Embolemidae, Plumariidae, Sclerogibbidae e Scolebythidae), totalizam cerca de 8.000 espécies. Todos os estudos que propõem as relações entre as famílias de Chrysidoidea foram baseados exclusivamente em dados morfológicos. O grupo-irmão de Bethylidae foi sugerido como sendo Scolebythidae (Brothers, 1975) ou Chrysididae (Carpenter, 1986), sendo a última a proposta melhor aceita atualmente (Brothers & Carpenter, 1993; Brothers, 1999; Carpenter, 1999; Ronquist, 1999).

Embora a maior parte das vespas parasitóides (subordem Aculeata) explore hospedeiros de vida livre de porte moderado a grande, os representantes de Bethylidae são adaptados para explorar larvas pequenas de hospedeiros escondidos em troncos ou sementes, imbricados no solo ou em serrapilheira (Evans, 1964). São primariamente parasitóides de larvas de coleópteros, porém uma linhagem (Bethylinae) se desenvolveu como parasitóide de larvas de microlepidópteros (Evans, 1964).

As principais sinapomorfias apontadas para Bethylidae são as antenas com o mesmo número de flagelômeros em ambos os sexos, pronoto com o ápice posterior lateral alcançando a tégula, asas com nervação reduzida, geralmente com três ou menos células fechadas nas asas anteriores e nenhuma nas asas posteriores (Finnamore & Brothers, 1993). Como adaptação ao habitat de seus hospedeiros, Bethylidae é uma família de vespas pequenas, medindo entre 1-10 mm, com corpo achatado e cabeça prognata, pernas fossoriais e asas com nervuras reduzidas (Evans, 1964). Membros de Bethylidae são ectoparasitóides idiobiontes (Figura 2.1) e se desenvolvem alimentando-se através de lesão tegumentar de seu hospedeiro sendo esse modo de vida considerado plesiomórfico na superfamília Chrysidoidea (Hanson & Gauld, 1995).

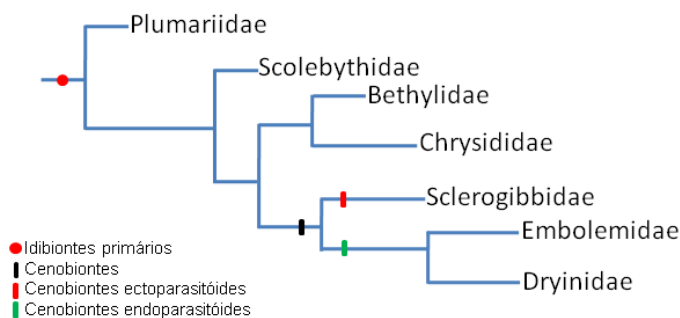


Figura 2.1. Proposta das relações entre as famílias de Chrysidoidea, baseadas em dados morfológicos, modificada de Hanson & Gauld (1995) e Carpenter (1999).

Bethylidae provavelmente é a maior família dentro da superfamília Chrysidoidea (Finnamore & Brothers, 1993). Atualmente é representada por 2.481 espécies, organizadas em 89 gêneros distribuídos em cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae, Scleroderminae e Pristocerinae) (Alencar & Azevedo, 2013) e uma fóssil (Azevedo & Azar, 2012). Uma subfamília fóssil (Lancepyrinae), encontrada em âmbar Libanês, é datada do período Cretáceo, com aproximadamente 120 milhões de anos (Azevedo & Azar, 2012). As subfamílias Epyrinae, Pristocerinae e Scleroderminae apresentam fósseis do período Cretáceo, datadas com cerca de 90 milhões de anos (Cockerell, 1920; Cockerell, 1917).

A sistemática de Bethylidae é bastante confusa e sua classificação interna ainda permanece controversa (Tabela 1), variando o número de subfamílias de quatro a seis, em estudos baseados exclusivamente em dados morfológicos.

No começo do Século XX, foram descritos muitos gêneros e espécies. No trabalho de Kieffer (1908), intitulado “*Genera Insectorum*” foram descritas 491 espécies em 58 gêneros de Bethylidae. Posteriormente, Kieffer (1914) reconheceu 660 espécies em 102 gêneros e apresentou uma chave para a identificação das espécies reconhecendo o grupo como subfamília Bethylinae com cinco tribos: Pristocerini, Sclerodermini, Epyrini, Mesitini e Bethylini.

Em 1928, Berland elevou Bethylinae ao status de família, com consequente classificação das tribos como subfamílias. Em uma revisão de 1964, Evans reconheceu quatro subfamílias em Bethylidae e rebaixou Scleroderminae como uma tribo de Epyrinae (Sclerodermini). Finalmente, Gauld & Bolton (1988) transferiram Bethylidae para Chrysidoidea.

Nagy (1974) estabeleceu a subfamília Galodoxinae baseado em *Galodoxa torquata* Nagy, 1974. Argaman (1988) estabeleceu a subfamília Afgoiogfinae baseado nos gêneros *Afgoiogfa* Argaman 1988 e *Parascleroderma* Kieffer, 1904. As subfamílias descritas baseadas em poucos exemplares logo foram desfeitas. Terayama (1996) sinonimizou Afgoiogfinae com Pristocerinae baseada em uma análise cladística. Azevedo & Lanes (2009) sinonimizaram Galodoxinae e Epyrinae e a espécie *Galodoxa torquata* foi alocada na então tribo Sclerodermini.

Terayama (2003a) estabeleceu a subfamília Parapenesiinae baseado em *Parapenesia unicolor* Kieffer, 1910. Mais tarde, Terayama (2006) transferiu Parapenesiinae para Plumariidae (Chrysidoidea).

Recentemente, Lanes & Azevedo (2008) realizaram análise cladística nas três tribos de Epyrinae (Cephalonomiini, Epyrini, e Sclerodermini), propondo a sinonimização da tribo Cephalonomiini com Sclerodermini. Alencar & Azevedo (2013) demonstraram a parafilia das tribos de Epyrinae *sensu* Lanes & Azevedo (2008), elevando Sclerodermini ao status de subfamília (Scleroderminae) e Epyrinae ficou restrita aos representantes de Epyrini. Finalmente,

Azevedo & Azar (2012) descreveram uma subfamília fóssil nova, Lancepyrinae, baseada na espécie *Lancepyris opertus* Azevedo, 2012 encontrada em âmbar.

Tabela 2.1. Alterações na classificação de Bethylidae através do tempo.

Autor	Kieffer (1914)	Berland (1928)	Evans (1964)	Nagy (1974)
Superfamília	Proctotrupoidea	Bethyloidea	Bethyloidea	Bethyloidea
Família	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae
Subfamília e tribo	Bethylinae a) Pristocerini b) Mesitiini c) Bethylini d) Epyrini e) Sclerodermini	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae Scleroderminae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini Galadoxinae
Autor	Argaman (1988)	Terayama (1996)	Terayama (2003a)	Terayama (2006)
Superfamília	Bethyloidea	Chrysidoidea	Chrysidoidea	Chrysidoidea
Família	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae
Subfamília e tribo	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini Afgoiogfinae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini Galadoxinae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini Galadoxinae Parapenesiinae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini c) Cephalonomiini Galadoxinae
Autor	Lanes & Azevedo (2008)	Azevedo & Lanes (2009)	Azevedo & Azar (2012)	Alencar & Azevedo (2013)
Superfamília	Chrysidoidea	Chrysidoidea	Chrysidoidea	Chrysidoidea
Família	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae	Bethylidae
Subfamília e tribo	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini Galadoxinae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae a) Sclerodermini b) Epyrini Lancepyrinae	Pristocerinae Mesitiinae Bethylinae Epyrinae Scleroderminae Lancepyrinae

Histórico dos estudos filogenéticos em Bethylidae

Evans (1964) realizou o primeiro trabalho com intuito de entender as relações entre as subfamílias de Bethylidae, porém este não foi um trabalho cladístico, foi mais uma estimativa, uma tentativa, de acordo com suas palavras, de entender as relações dentro de Bethylidae. Em seu trabalho Bethylinae aparece como grupo-irmão de Pristocerinae + Epyrinae (Figura 2.2.a).

A primeira análise filogenética envolvendo todas as subfamílias de Bethylidae reconhecidas na época foi realizada por Sorg (1988), que discutiu as relações entre os gêneros dentro das subfamílias, incluindo as tribos dentro de Epyrinae. Em sua análise, Sorg (1988) propôs Bethylinae como um grupo-irmão do agrupamento formado por Pristocerinae+ (Mesitiinae+Epyrinae) (Figura 2.2.b). Porém, Sorg (1988) não encontrou apomorfias para Epyrinae e levanta a possibilidade da parafilia desse grupo, sugerindo uma revisão taxonômica.

Carpenter (1999) refez as análises de Sorg (1988), com pequenas modificações, e observou a mesma topologia proposta por Sorg (1988), sem indicar sinapomorfias para Epyrinae.

O terceiro trabalho filogenético envolvendo as subfamílias de Bethylidae utilizou seis subfamílias (Pristocerinae, Epyrinae, Mesitiinae, Galodoxinae, Afgoiogfinae e Bethylinae) e recuperou o arranjo (Pristocerinae+(Afgoiogfinae+Parapenesiinae)) como grupo-irmão de Bethylinae+(Epyrinae+Mesitiinae+Galodoxinae) (Terayama, 2003a; Figura 2.2.c).

Recentemente, Carr *et al.* (2010) realizaram o primeiro estudo envolvendo sequências dos genes ribossomais nuclear da subunidade 28S (28S rDNA) e mitocondrial da subunidade 16S (16S rDNA). Os autores encontraram suporte para atestar a monofilia de Bethylidae, recuperando Bethylinae como grupo-irmão de Epyrinae (Epyrini e Sclerodermini), Mesitiinae e Pristocerinae. O clado Mesitiinae agrupou com o clado Sclerodermini, revelando Epyrinae como parafilética. Epyrini foi recuperada como monofilética pela primeira vez, mas não foi demonstrado se a tribo era mais relacionada aos Pristocerinae ou ao clado formado por Mesitiinae+Sclerodermini (Figura 2.2.d).

Em 2013, Alencar & Azevedo verificaram a parafilia de Epyrinae, recuperaram a tribo Sclerodermini como grupo-irmão de (Epyrinae+(Pristocerinae+Mesitiinae)) e tomaram a decisão de elevar a tribo ao status de subfamília (Figura 2.2.e).

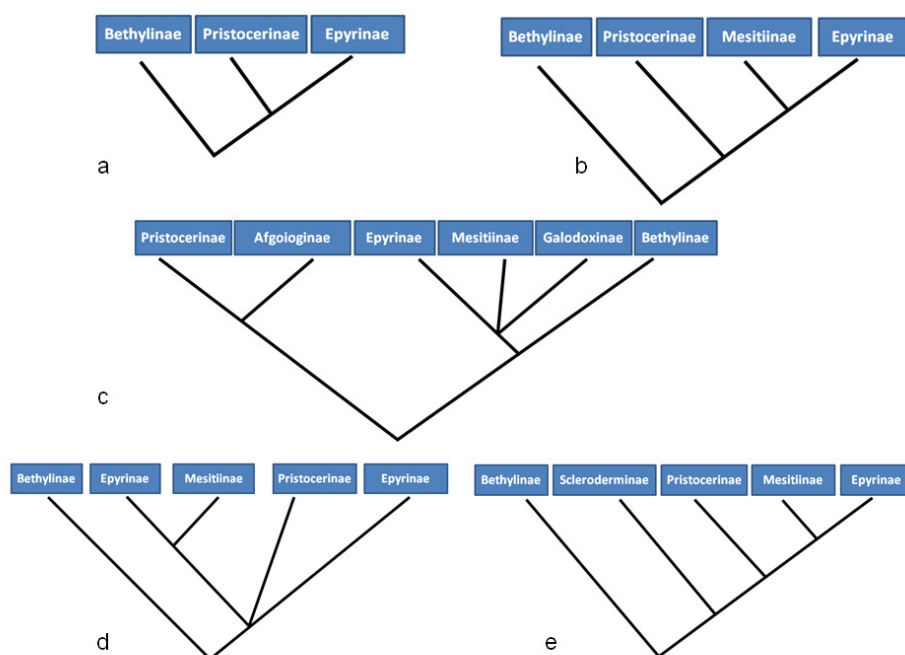


Figura 2.2. Hipóteses filogenéticas disponíveis para a relação entre as subfamílias de Bethylidae. a) Evans (1964); b) Sorg (1988) e Carpenter (1999); c) Terayama (2003a); d) Carr *et al.*(2010) e) Alencar & Azevedo (2013).

Tendo em vista que a relação entre as subfamílias de Bethylidae ainda não estão esclarecidas, uma vez que trabalhos baseados tanto em dados morfológicos quanto em dados moleculares não apresentam um consenso sobre a topologia interna dos clados, é necessário o investimento em um estudo mais abrangente que se baseie em um maior número de representantes e de caracteres analisados.

Desse modo, o presente estudo pretende utilizar uma amostra mais representativa dos gêneros de Bethylidae e três marcadores moleculares para propor relações filogenéticas entre as subfamílias de Bethylidae, datar o período de diversificação das mesmas, além de estudar o padrão de distribuição geográfico histórico para entender a distribuição atual de Bethylidae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

O grupo interno foi composto de 97 sequências obtidas no presente trabalho e de 28 sequências retiradas do GenBank, sendo 16 sequências comuns a gêneros utilizadas no presente estudo e duas sequências de gêneros exclusivos do GenBank (*Rhabdepyris* Kieffer, 1904 e *Cephalonomia*). No total, utilizou-se 125 sequências pertencentes a 50 dos 89 gêneros viventes de Bethylidae (Tabela 2.2). Sequências do GenBank de exemplares de Aculeata foram utilizadas como grupo externo. Para a matriz do gene COI foram utilizadas sequências do GenBank de *Tatuidris tatusia* da família Formicidae (JX82795) e *Apis nigrocincta* da família Apidae (DQ020232). Na matriz do gene 28S rDNA foram utilizadas as sequências de cinco espécies de Aculeata: *Apis nigrocincta* (AF181591); *Dolichovespula arenaria* (GU596723); *Bupon sp* (GU213974); *Cleptes semiauratus* (GU213975) e *Chrysis ruddii* (GU213973). Para a análise referente ao gene 16S rDNA foi utilizado uma matriz genética com 50 táxons, sendo três táxons referentes ao grupo externo: *Chrysis analis* (AJ514344); *Trichrysis cyanea* (AJ514362) e *Apis nigrocincta* (AF181581). Na análise concatenada foram utilizadas as sequências dos três genes do exemplar de *Apis nigrocincta* como grupo externo.

A classificação para subfamílias e para gêneros de Scleroderminae foi baseada em Alencar & Azevedo (2013) e Lanes & Azevedo (2008). O gênero *Foenobethylus* Kieffer, 1913 foi classificado segundo Várkonyi & Polaszek (2007). Um gênero utilizado nesse trabalho está sendo descrito por Gobbi, (*in prep*) e será aqui referido como *gênero nov.*, os demais gêneros seguiram a classificação utilizada por Terayama (2003b).

Todos os exemplares de Bethylidae utilizados no presente estudo estão tombados na Coleção Entomológica da Universidade Federal do Espírito Santo em via úmida e em via seca.

Tabela 2.2. Gêneros de Bethylidae utilizados no presente estudo, com destaque nos genes analisados por gênero: citocromo oxidase I (COI), RNA ribossomal 16S (16S rDNA) e 28S (28S rDNA).

Família: Subfamília	Gênero	16S rDNA	COI	28S rDNA
Bethylidae: Bethylinae	<i>Bethylus</i>	✓	✓	✓
	<i>Eupsenella</i>		✓	✓
	<i>Goniozus</i>	✓	✓	✓
	<i>Lytopsnella</i>	✓	✓	✓
	<i>Odontepyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Prosierola</i>		✓	✓
	<i>Sierola</i>		✓	✓
Bethylidae: Epyrinae	<i>Anisepyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Bakeriella</i>		✓	✓
	<i>Disepyris</i>		✓	✓
	<i>Epyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Formosiepyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Holepyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Trachepyris</i>	✓	✓	✓
	<i>Rhabdepyris</i> sp	✓	✓	
	<i>Laelius</i>	✓		✓
Bethylidae: Mesitiinae	<i>Codorcas</i>			✓
	<i>Clytovorus</i>			✓
	<i>Heterocoelia</i>		✓	✓
	<i>Metrionotus</i>	✓	✓	✓
	<i>Mesitius</i>		✓	✓
	<i>Pilomesitius</i>	✓	✓	✓
	<i>Pseudomesitius</i>		✓	✓
	<i>Sulcomesitius</i>		✓	✓
	<i>Ukayakos</i>			✓
	<i>Zimankos</i>		✓	✓
	<i>Itapayos</i>			✓
Bethylidae: Pistocerinae	<i>Acrepyris</i>		✓	✓
	<i>Apenesia</i>	✓	✓	
	<i>Disсомphalus</i>	✓	✓	✓
	<i>Foenobethylus</i>		✓	✓
	<i>Kathepyris</i>			✓
	<i>Parascleroderma</i>	✓	✓	✓
	<i>Pristocera</i>	✓	✓	✓
	<i>Caloapenesia</i>	✓	✓	
	Gênero nov.		✓	
	<i>Protisobrachium</i>		✓	✓
	<i>Trichiscus</i>		✓	✓
	<i>Neoapenesia</i>		✓	
	<i>Pseudobrachium</i>	✓	✓	✓
Bethylidae: Scleroderminae	<i>Allobethylus</i>	✓		✓
	<i>Cephalonomia</i>	✓	✓	✓
	<i>Discleroderma</i>		✓	✓
	<i>Glenosema</i>	✓	✓	
	<i>Prorops</i>	✓	✓	✓
	<i>Plastanoxus</i>	✓		
	<i>Sclerodermus</i>	✓	✓	✓
	<i>Solepyris</i>		✓	✓
	<i>Tuberepyris</i>			✓

Métodos

Extração, amplificação por PCR e sequenciamento do DNA

A extração de DNA total foi realizada a partir do abdome e da genitália, utilizando o kit de extração de DNA NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), diluindo a amostra em média a 40 µl. O extrato de DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific).

Foi realizada a amplificação dos fragmentos utilizando a reação em cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador ABI Veriti® para um volume final de 25 µl. As reações de PCR continham 1x de solução tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada *primer* e 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Inc.). O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 94°C por 60 segundos; (2) 40 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 44-55°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 10 minutos.

Foram amplificados os genes mitocondriais 16S rDNA, Citocromo oxidase I (COI), e o gene nuclear 28S rDNA, utilizando os *primers* descritos Tabela 2.3.

Tabela 2.3. *Primers* utilizados no presente estudo.

Gene	Código	Sequência (5'→3')	Referência
28S rDNA	Forward (F2)	CGT GTT GCT TGA TAG TGC AGC	Belshaw & Quicke (1997)
	Reverse (D3)	TAG TTC ACC ATC TTT CGG GTC	Mardulyn & Whitfield (1999)
	Reverse interno (D3I)	GACCCATCCTCCCTCGGTC	Presente estudo
16S rDNA	Forward (16WA)	CAC CTG TTT ATC AAA AAC AT	Dowton & Austin (1994)
	Reverse (16WB)	CGT CGA TTT GAA CTC AAA TC	Dowton & Austin (1994)
COI	Reverse (HCO2198)	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTT GG	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	Forward (LCO2198)	TAA ACTT CAG GGT GAC CAA AAA ATCA	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	Forward (APL-2176F)	GGT ACA GGT TGA ACTG TTT ACC C	Pedersen (1996)
	Reverse (APL-2176R)	GGG TAA ACA GTT CAA CCT GTA CC	Presente estudo

A amplificação parcial do gene COI (~630pb) foi realizada utilizando-se como padrão os *primers* HCO 2198 e LCO 1490. Entretanto, quando o DNA se encontrava muito degradado e/ou apresentava amplificação cruzada com contaminadores, foram utilizados *primers* internos menores e mais específicos AP-L-2176F e HCO 2198 (335 pb) e LCO 2198 e AP-L-2176R (335 pb). Para amplificar a região D2/D3 de 28S rDNA (680 pb) foram utilizados os *primers* F2 e D3. Para casos de amplificação cruzada de DNA de fungos ou outros contaminantes presentes nas amostras, foi utilizados os *primers* F2 e D3I, gerando um fragmento de aproximadamente 570 pb. Para amplificar o gene 16S rDNA foram utilizados os *primers* 16WA e 16WB, gerando um fragmento de 530 pb.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e o tamanho e qualidade das bandas estimadas com auxílio do *ladder* de 1Kb. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT®. As sequências foram geradas no Núcleo de Genética Aplicado à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES e na MACROGEN Inc. (Seoul, Korea) (<http://dna.macrogen.com>).

A identidade das sequências foram confirmadas através do método BLAST (Altschul, 1997) que compara as sequências geradas com as disponíveis no GenBank.

Análises filogenéticas

O gene COI foi alinhado de acordo com a sequência de aminoácidos da respectiva proteína no programa MEGA ver. 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) através do programa CLUSTALX ver. 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). As sequências dos genes 16S e 28S rDNA foram alinhadas separadamente utilizando o portal MAFFT v.6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online>), por meio da estratégia Q-INS-I, levando em consideração a estrutura secundária do RNA para um conjunto de dados pequenos (<200 taxa) de acordo com (Katoh *et al.*, 2009).

As divergências genéticas foram estimadas no programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), segundo o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). As mutações do tipo inserções-deleções (*indels*) foram consideradas como sendo deleções completas e por isso não entraram no cálculo. O cálculo de tendência da composição nucleotídica (*bias*) também foi realizado no programa MEGA5. O grau de saturação das sequências foi verificado no programa DAMBE 5.0.23 (Xia & Xie, 2001) através do teste de Xia (Xia *et al.*, 2003).

Foram realizadas análises filogenéticas para cada gene em separado e para todos os genes concatenados. Os modelos de substituição nucleotídicas usados nas análises foram selecionados para cada marcador individualmente aplicando o critério de informação Bayesiana implementado no programa MODELTEST ver. 0.1 (Posada, 2008). As relações filogenéticas foram estimadas através de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV).

Para as análises de IB, foi utilizado o programa MRBAYES ver. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Na análise com os genes concatenados, cada partição utilizou modelos evolutivos independentes (*unlinked models*). As buscas consistiram em duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas (uma *cold chain* e três *heated chains*). As cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) foram conduzidas com trinta 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. O suporte dos ramos foi obtido através das probabilidades posteriores e a confiabilidade dos clados foi aceita quando a probabilidade posterior foi superior a 0,95.

A análise de MV foi realizada no portal CIPRES (www.phylo.org/sub_sections/portal) utilizando a ferramenta RAxML Bootstrapping (Stamatakis *et al.*, 2008). Na análise dos genes concatenados, cada partição foi submetida a modelos evolutivos de forma independente e foram realizadas 1000 replicações de *Bootstrap* (BT) para evidenciar o grau de confiabilidade dos clados, sendo aceitos os valores mínimos de 60. A visualização e a editoração das árvores filogenéticas foram realizadas no programa FigTree v1.0.4.

Estimativa de tempo de divergência

Para a estimativa de tempo de divergência foi gerada uma árvore baseada na IB dos genes COI e 28S rDNA concatenados. Cada gene foi considerado uma partição separada e tratados com modelos evolutivos separados (*unlik-models*).

O tempo de divergência foi estimado no programa BEAST versão 1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012), com relógio relaxado e distribuição log-normal e taxas de mutação não correlacionadas, considerando que cada ramo pode apresentar taxas de substituição separadas. O parâmetro *Speciation- Birth-Death Process* foi utilizado na opção *Tree Prior*.

Foram realizadas duas análises independentes, cada uma com 30 milhões de interações. Os arquivos "log" das duas corridas foram combinados através do software LOGCOMBINER V1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012), sendo descartadas (*burn-in*) 25% das árvores. O tamanho efetivo da amostra (*Effective sample size*) foi avaliado segundo os parâmetros do software TRACER Versão 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007). Nesse programa ainda foram verificadas a média de estimativas dos parâmetros e as máximas densidades posteriores 95% (HPDs). A árvore foi sumarizada a partir do arquivo "log" combinado das duas corridas, através do software TREEANNOTATOR 1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007).

As inferências sobre a divergência de tempo para o mais recente ancestral comum (MCRA) foram implementadas usando sete idades de dados fósseis disponíveis como restrições dos nós (*node age constraints*), indicados por letras na Figura 2.7. A idade máxima da raiz (*maximum root age*) foi calibrada aplicando-se o parâmetro de distribuição normal sendo indicado o máximo de 168 milhões de anos para o surgimento de Aculeata (Brady *et al.*, 2009). A calibração do nó Apidae (idade A) foi calculada sob distribuição normal, com idade mínima de 100 milhões de anos, baseada no fóssil mais antigo para Apidae (Brady *et al.*, 2009). A calibração do nó do ancestral comum mais recente compartilhado entre Bethyridae e Chrysididae (idade B) foi feita sob distribuição normal, com idade mínima de surgimento de 135 milhões de anos, uma vez que fósseis mais antigos para Chrysidoidea datam do Cretáceo superior (Engel & Grimaldi, 2006; Rasnitsyn, 2010; Ortega-Blanco *et al.*, 2011). O nó ancestral de Bethyridae (idade C) foi calibrado com distribuição exponencial com idade mínima baseada no fóssil mais antigo da família (Lancepyrinae) com estimativa mínima de 120 milhões de anos

(Azevedo & Azar, 2012). Os nós das subfamílias, *Pristocerinae* (idade D), *Scleroderminae* (idade E) e *Epyrinae* (idade F) foram calibrados com idade mínima de 90 milhões de anos com distribuição normal, baseados nos fósseis mais antigos para cada subfamília, que foram encontradas em âmbar de Burma (Cokerell, 1917; 1920).

Para testar algum possível desvio no tempo de divergência causado pelo gene mitocondrial foram realizadas análises utilizando os mesmos parâmetros com cada gene separado, a fim de verificar alguma discrepância entre as datas estimadas.

Inferência Biogeográfica

Foi realizada uma abordagem analítica com o intuito de propor uma hipótese sobre a história biogeográfica de *Bethylidae* elaborada a partir de dados filogenéticos e de distribuição geográfica. Para tanto foi utilizando o software DIVA (Ronquist, 1997) que através do método de parcimônia, permite a otimização das áreas ancestrais nos nós da árvore filogenética, minimizando o número de eventos de dispersão e de extinção em relação a eventos de vicariância. Foram definidas seis áreas de distribuição relevantes: (A) Etiópica, (B) Neotropical, (C) Australiana, (D) Oriental, (E) Paleártica e (F) Neártica. O grupo externo foi definido como ocupando todas as áreas que compunham o continente da Gondwana (ABCD) e foi realizado um levantamento da distribuição geográfica de cada gênero para avaliar a ocorrência e abundância em cada região zoogeográfica utilizando dados disponíveis na literatura para gerar o arquivo de entrada da distribuição dos gêneros no programa DIVA, (Fouts, 1936; Terayama, 2003b; Azevedo, 2006; Azevedo & Guimarães, 2006; Macek *et al.*, 2007; Mugrabi & Azevedo, 2010).

RESULTADOS

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Foram extraídos o DNA de 471 exemplares, dos quais somente 20% (97 indivíduos) geraram DNA e produtos de PCR a serem utilizados no presente estudo. Somados às 28 sequências do GenBank, foram amostrados 50 gêneros, representando 56% dos gêneros viventes de *Bethylidae*. Para *Bethylinae*, 100% dos gêneros viventes foram amostrados, para as demais subfamílias foram obtidos 52% (*Epyrinae*), 42% (*Scleroderminae*), 50% (*Mesitiinae*) e 59% (*Pristocerinae*).

Várias sequências geradas, quando testadas com a ferramenta BLAST, apresentaram mais de 85% de similaridade com lepidópteros da família *Geometridae*, insetos praga de coleção

(*Liposcelis bostrychophila*), Bactérias (*Wollbachia*), fungos (*Aspergillus*) e até mesmo contaminação com humanos. Nesses casos houve a tentativa de amplificar o DNA do exemplar com um *primer* mais específico, que evitava a contaminação cruzada.

A matriz de dados do gene COI, após deleção das extremidades, apresentou 646 pb, correspondentes a 61 táxons terminais, sendo dois referentes ao grupo externo. Não foi verificada saturação em nenhuma das posições de códon (índice de saturação de sequências menor que o valor crítico ($ISS < ISS.C$)).

O alinhamento das sequências dos genes ribossomais revelou um número grande de *indels*, intercalados por blocos grandes de homologies, padrão típico de alinhamento de sequências ribossomais. A matriz de dados do gene 16S rDNA apresentou 496 pb, com 50 táxons terminais, sendo três referentes ao grupo externo. A matriz do gene 28S rDNA contém 780 pb de 98 táxons terminais, sendo cinco referentes ao grupo externo.

A matriz de dados combinados dos três genes foi formada por 1797 pb, sendo 651 pb do gene COI; 481 pb do gene 16S rDNA e 660 pb do gene 28S rDNA, correspondente a 43 táxons terminais, sendo um referente ao grupo externo.

Relações filogenéticas entre as subfamílias

O modelo evolutivo que melhor se adequou às análises para os genes COI e 16S rDNA foi o GTR+I+G, enquanto que para o gene 28S rDNA foi o GTR+G. As filogenias obtidas para cada gene tanto com MV quanto IB mostraram topologias semelhantes.

Somente o gene 28S rDNA (Figura 2.3) recuperou Bethylidae como grupo monofilético com alto suporte (BT>98, PP=1.00).

A análise do gene mitocondrial COI (Figura 2.3.a) não forneceu suporte para o monofiletismo de Bethylidae, nem para as subfamílias Epyrinae e Scleroderminae. Três subfamílias foram recuperadas como grupos monofiléticos, com alto valor de suporte: Bethylinae (BT=97; PP=0.99), Pristocerinae (BT=72; PP=0.92), e Mesitiinae (BT=100; PP=1.00). A subfamília Bethylinae foi recuperada como grupo-irmão das demais subfamílias. Membros de Scleroderminae agrupam como irmão de Mesitiinae (BT=97, PP=0.99) e parafilético. A relação entre as demais subfamílias não foi esclarecida.

A análise do gene mitocondrial 16S rDNA (Figura 2.3.b) apresentou pouca resolução, não sendo possível recuperar Bethylidae como um grupo monofilético. As subfamílias Mesitiinae e Bethylinae formaram agrupamentos monofiléticos, porém as relações entre as subfamílias não foram recuperadas.

A árvore inferida a partir do gene 28S rDNA (Figura 2.3.c) também mostrou Bethylidae como grupo monofilético com alto suporte (BT=82; PP=0.99), enquanto Bethylinae aparecem como grupo-irmão das demais subfamílias. As relações entre as demais subfamílias

permanecem sem esclarecimento, exceto pela confirmação da associação entre Scleroderminae e Mesitiinae.

A análise concatenada dos três genes recuperou Bethyridae como grupo monofilético com alto suporte (BT=99, PP=1.00), assim como Bethyridae, Pristocerinae, Epyrinae e Mesitiinae (Figura 2.4). As relações entre as subfamílias puderam ser inferidas, demonstrando Bethyridae como grupo-irmão das demais famílias com alto suporte (BT=100; PP=0,99), seguido pela topologia Pristocerinae+(Epyrinae+(Scleroderminae+Mesitiinae)).

Distância genética dentro e entre as subfamílias

A divergência dentro da família Bethyridae foi de 33% para o COI, 27% para o gene 16S rDNA e 17% para o gene 28S rDNA. Dentro das subfamílias, as menores divergências foram observadas dentro das subfamílias Mesitiinae e Bethyridae, enquanto a maior divergência encontrada, para os três genes, foi dentro de Pristocerinae e Epyrinae (Tabela 2.4).

A divergência entre as subfamílias variou de 23-38% para o COI, 23-30% para o 16S rDNA e 11-23% para o 28S rDNA. Em todos os casos, as divergências genéticas foram maiores para os genes mitocondriais COI e 16S rDNA, quando comparados com o gene nuclear 28S rDNA (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Distância genética entre as subfamílias de Bethyridae calculadas para cada gene, em negrito a distância dentro de cada subfamília, em parêntese, a distância dentro da família para cada gene.

COI (33%)	1	2	3	4	5
1 Bethyridae	0,24				
2 Scleroderminae	0,30	0,24			
3 Mesitiinae	0,32	0,23	0,20		
4 Epyrinae	0,28	0,27	0,30	0,27	
5 Pristocerinae	0,36	0,37	0,38	0,36	0,44
16S rDNA (27%)	1	2	3	4	5
1 Bethyridae	0,12				
2 Scleroderminae	0,27	0,27			
3 Mesitiinae	0,23	0,28	0,16		
4 Epyrinae	0,26	0,30	0,29	0,31	
5 Pristocerinae	0,26	0,30	0,27	0,29	0,34
28S rDNA (17%)	1	2	3	4	5
1 Bethyridae	0,07				
2 Scleroderminae	0,14	0,08			
3 Mesitiinae	0,17	0,11	0,03		
4 Epyrinae	0,23	0,20	0,20	0,15	
5 Pristocerinae	0,17	0,15	0,14	0,22	0,10

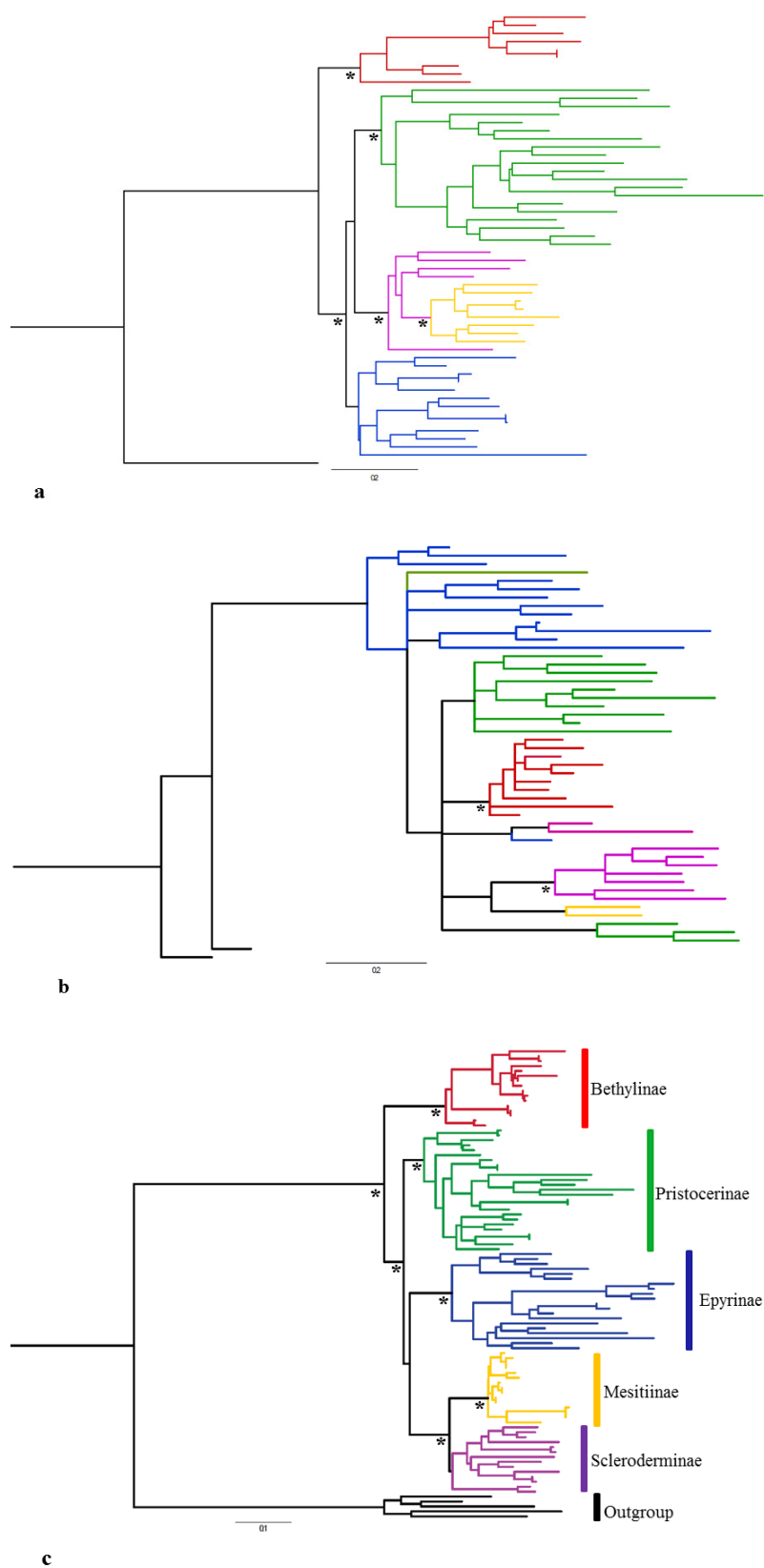


Figura 2.3. Hipóteses de filogenia de Bethyloidea inferidas para os três genes a) COI, b) 16S rDNA e c) 28S rDNA. Asteriscos indicam valores de suporte superior de PP= 0,95 (IB) e BT=60 (MV). As cores dos ramos correspondem aos representantes de cada subfamília conforme apontado em (c)

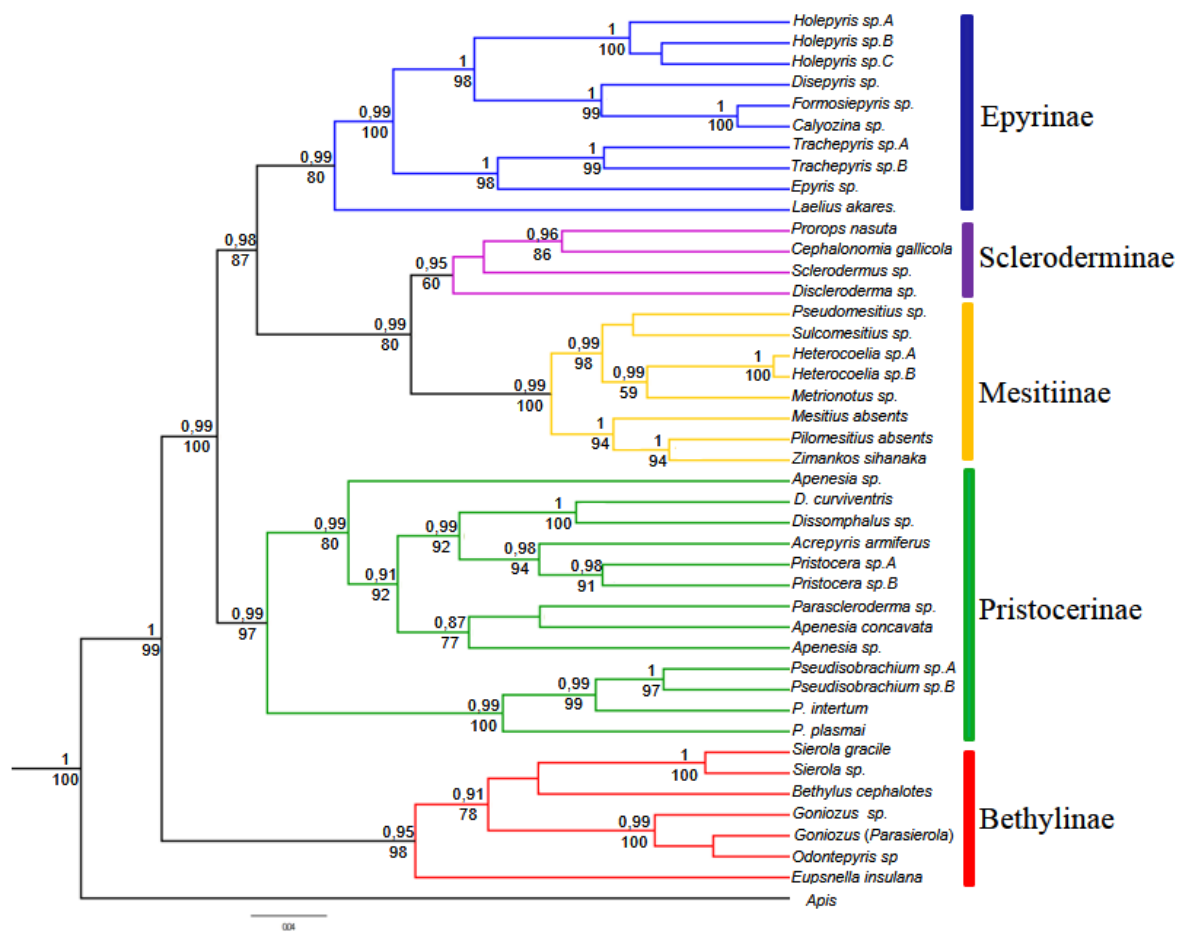


Figura 2.4. Filogenia proposta para Bethylidae inferida pela análise combinada dos genes 16S rDNA, COI e 28S rDNA. A árvore mostrada foi derivada da análise de Inferência Bayesiana (30 milhões de gerações). Valores de suporte referentes à *Probabilidade a Posteriori* estão indicados acima dos ramos e valores de *Bootstrap* (1000 replicações) referentes à análise de MV estão indicados abaixo dos ramos.

Composição nucleotídica

Os genes mitocondriais apresentaram a tendência típica de um conteúdo rico nos nucleotídeos A-T, enquanto o gene ribossomal apresentou uma composição equilibrada de nucleotídeos (Figura 2.3).

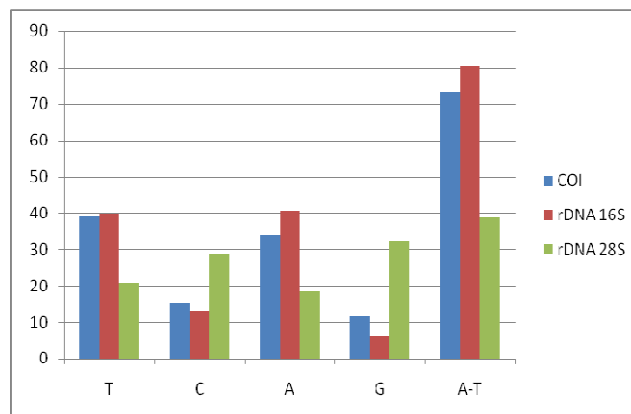


Figura 2.5. Frequência nucleotídica (%) de Bethylidae para os três genes analisados evidenciando a tendência de conteúdo alto de A-T nos genes mitocondriais.

Distribuição Biogeográfica

De acordo com o levantamento realizado para definir a distribuição zoogeográfica de Bethylidae, as regiões com maior ocorrência de gêneros vivos é a Etiópica e a Oriental (Tabela 2.5).

De acordo com a análise de DIVA, Bethylidae teve o centro de origem (área ancestral) entre as regiões da Austrália (área C) e Índia-Madagascar (área D), quando essas áreas estavam interligadas no antigo continente da Gondwana (Figura 2.6).

Bethylinae, por sua vez, teve uma origem na porção sul da Gondwana, se conectando com Austrália (área C) e América (área B) através da Antártica.

As demais subfamílias apresentam seu centro de diversificação na região que compreendia Índia-Madagascar (área D) e África (área A). Baseado nesses dados, a presença atual de Bethylidae nas regiões Neártica e Paleártica são associadas a eventos de dispersão.

Tabela 2.5. Sinopse Zoogeográfica dos gêneros vivos de Bethylidae

Subfamília	Região ¹						Nº total de gêneros
	ORI	AUS	ETH	NEA	PAL	NET	
Mesitiinae	8	-	10	-	10	-	22
Bethylinae	2	4	2	6	3	3	7
Scleroderminae	8	8	7	7	7	11	21
Epyrinae	12	3	10	8	7	8	17
Pristocerinae	8	2	16	5	7	5	22
Total	44	19	45	26	34	27	89

¹PAL: Paleártica, ORI: Oriental, AUS: Australiana, ETH, Etiópica, NEA: Neártica, NET: Neotropical. Número de gêneros obtidos pela compilação

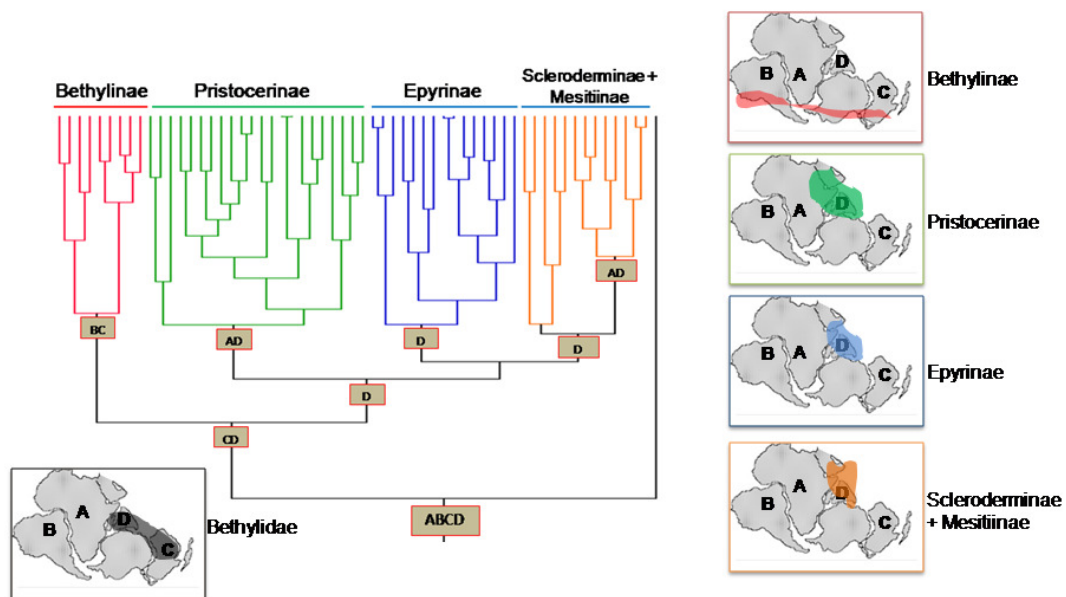


Figura 2.6. Estimativa do centro de origem para os principais clados de Bethylidae, a partir da árvore gerada por inferência bayesiana com gene COI, realizado pelo programa DIVA, sendo as regiões: (A) Etiópica, (B) Neotropical, (C) Australiana, (D) Oriental, (E) Paleártica e (F) Neártica.

Análise do Relógio Molecular

O relógio molecular fixou a origem de Aculeata em 158 m.a.a. e mostrou o compartilhamento do último ancestral comum entre Bethylidae e Chrysididae por volta de 143 m.a.a. (Figura 2.7).

Os dados apontam para uma separação em duas linhagens por volta de 136 m.a.a. As subfamílias *Pristocerinae* foram datadas com surgimento há 93,2 m.a.a. As datas de surgimento de *Epyrinae* *Scleroderminae* foram registradas há 85 e 79,7 m.a.a., respectivamente. *Mesitiinae* surgiram recentemente, em torno de 45 m.a.a. Os membros vivos de *Bethylinae* apresentaram origem aproximada de 63 m.a.a. O intervalo de confiança com 95% de confiabilidade está sumarizado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Estimativas de tempo de divergência (milhões de anos atrás) para os nós de *Bethylidae*. Os valores médios do tempo de divergência foram calculados com dados combinados dos genes COI e 28S, e com os dois genes separados. Os maiores e menores intervalos de confiança são mostrados para a análise com genes 28S e COI concatenados, (95% *Upper Highest Posterior Density* -UHPD e 95% *lower Highest Posterior Density* - LHPD).

Clado	Valor médio (COI+28S)	Intervalo de confiança (COI +28S) (UHPD-LHPD)	Valor médio (COI)	Valor médio (28S)
A (Aculeata)	164,0	146,6-181,5	158,3	161,8
B (Chrysididae)	143,19	128,5-157,4	139,7	141,7
C (Bethylidae)	136,05	120,9-150,0	129,2	123,4
D (Pristocerinae)	93,28	79,4-107,8	102,8	83,6
E (Scleroderminae+ Mesitiinae)	86,49	70,8-101,6	69,8	73,14
F (Epyrinae)	85,22	71,6-99,1	80,8	87,0
Bethylinae	74,3	45,5-106,0	79,7	61,4
Mesitiinae	45,33	31,8-61,1	50,9	24,8
Scleroderminae	79,72	65,5-94,9	61,5	73,14

No trabalho desenvolvido por Carr *et al.* (2010) com dados moleculares, a despeito da falta de resolução para determinar a posição das outras subfamílias, Bethylinae foram recuperados como grupo-irmão das demais subfamílias com alto suporte. No estudo desenvolvido por Azevedo & Azar (2012) mesmo com a inclusão de uma subfamília fóssil, a posição basal de Bethylinae se manteve em relação às demais subfamílias.

O gênero *Lytopsenella* é tradicionalmente considerado o gênero mais basal, não somente de Bethylinae, mas de toda a família Bethylidae (Evans, 1964; Sorg, 1988). Esse gênero possui várias características que são passíveis de redução em sua condição plesiomórfica hipotética (número de segmentos antenais, palpos maxilares e labiais, e nervação das asas) (Polaszek & Krombein, 1994). Em nossa análise, foi possível recuperar *Lytopsenella* e *Eupsenella* como grupo-irmão dos demais gêneros de Bethylinae, um dado inédito na literatura.

Embora os estudos cladísticos anteriores que envolveram *Pristocerinae* não tenham fornecido suporte para determinar a posição de *Pristocerinae* em relação às demais subfamílias, nossos dados apontam que *Pristocerinae* formam um grupo basal e irmão das demais subfamílias (*Pristocerinae*+(*Epyrinae*+(*Scleroderminae*+*Mesitiinae*))). A topologia que mais se assemelha à obtida nesse estudo é a proposta de Sorg (1988) e Carpenter (1999), que aponta *Pristocerinae* como grupo-irmão do clado formado por *Epyrinae* e *Mesitiinae*. Porém, como sugerido por Carpenter (1999), o suporte para o clado (*Pristocerinae*+(*Epyrinae*+*Mesitiinae*)) obtido no trabalho de Sorg (1988) é fraco, pois as sinapomorfias para esse agrupamento envolvem redução das nervuras das asas anteriores (Rs+M) e célula marginal aberta, características que estão presentes também em *Chrysididae*, o grupo-irmão de *Bethylidae*, e é polimórfica em *Bethylinae*.

O trabalho desenvolvido por Terayama (2003a) recuperou *Pristocerinae* agrupados com *Afgoiogfinae* e grupo-irmão das demais subfamílias segundo a topologia ((*Pristocerinae*+*Afgoiogfinae*) + (*Bethylinae*+ (*Epyrinae* + *Mesitiinae* + *Galodoxinae*))). É válido ressaltar que em seu trabalho envolvendo 24 caracteres, somente 11 foram informativos do ponto de vista cladístico e que, com essa matriz de caracteres, o autor conseguiu agrupar o gênero *Parapenesia* (atualmente alocado em *Plumariidae*) em *Pristocerinae*. Esses dados sugerem cautela ao considerar a topologia adquirida baseado na seleção desses caracteres.

O trabalho desenvolvido por Alencar & Azevedo (2013) propôs a topologia (*Bethylinae*+(*Scleroderminae*+(*Pristocerinae*+*Mesitiinae*))+*Epyrinae*)). O agrupamento *Pristocerinae*+*Mesitiinae* foi baseado no compartilhamento de dois caracteres em uma lista de 391 caracteres (presença do calo supraposterior na mesopleura e protocanter tão longo quanto a procoxa). Embora esse trabalho traga contribuições sobre a relação entre as subfamílias, o foco principal era testar a monofilia de *Epyrinae*, e os caracteres escolhidos não eram os ideais para testar as relações entre as subfamílias.

No trabalho desenvolvido por Azevedo & Azar (2012) envolvendo as subfamílias de Bethylidae, novamente as escolhas dos caracteres não buscou resolver as relações entre as subfamílias e sim determinar a posição de um exemplar fóssil. Esse trabalho considerou 31 caracteres reconhecidamente úteis para distinguir tribos e subfamílias e recuperou a topologia (Bethylinae+(Lancepyrinae+(Scleroderminae+(Mesitiinae+Epyrinae+Pristocerinae)))).

Segundo a topologia recuperada em nosso estudo, o clado irmão de Pristocerinae é formado por Epyrinae+(Scleroderminae+Mesitiinae). Essa topologia difere da proposta por Sorg (1988), Carpenter (1999) e Terayama (2003a), pois Scleroderminae era considerada uma tribo de Epyrinae *sensu* Evans (1964), inclusive, devido a esse fato, esses autores foram incapazes de apontar qualquer sinapomorfia para Epyrinae. Carr *et al.* (2010) detectaram a parafilia de Epyrinae *sensu* Evans (1964) evidenciando a necessidade de se fazer uma revisão da subfamília. Após a separação de Sclerodermini de Epyrinae por Alencar & Azevedo (2013) os autores apontaram pela primeira vez uma sinapomorfia para a subfamília Epyrinae: pecíolo com raiz e corpo fundidos.

O agrupamento encontrado no presente estudo formado por Scleroderminae *sensu* Alencar & Azevedo (2013) e Mesitiinae já havia sido apontado por Carr *et al.* (2010). Os autores, por terem usado apenas um representante de Mesitiinae, ressaltaram a necessidade de estudos complementares para verificar a validade desse agrupamento incluindo mais representantes dessa subfamília, além da necessidade de se encontrar sinapomorfias para esse arranjo inesperado. No presente estudo utilizamos uma amostra mais representativa, com metade dos gêneros reconhecidos de Mesitiinae, e corroboramos o agrupamento Scleroderminae+Mesitiinae, porém sem apontar a sinapomorfia para esse arranjo. Dados morfológicos de Mesitiinae mostram que a subfamília apresenta uma quantidade enorme de autapomorfias, com características não observadas em outras subfamílias como, por exemplo, coloração preta marcante e vermelha brilhante e espinhos no propódeo (Argaman, 2003). Por ter acumulado autapomorfias tão rapidamente, Mesitiinae divergiu morfológicamente de Scleroderminae de tal forma que nenhum autor, utilizando dados morfológicos, conseguiu apontar essas duas subfamílias como sendo relacionadas.

Como mostrado, Bethylidae teve um histórico de classificação conturbado, os estudos cladísticos desenvolvidos recentemente com dados morfológicos foram de grande valia para o melhor entendimento do arranjo interno da família. Esses estudos resultaram na sinonimização da tribo Cephalomiini (Lanes & Azevedo, 2008), sinonimização das subfamílias Galodoxinae (Azevedo & Lanes, 2009) e Afgoiogfinae (Terayama, 2003a) e principalmente, na separação de Scleroderminae, que equivocadamente foi considerado por Evans (1964) como uma linhagem de Epyrinae (Alencar & Azevedo, 2013).

A incorporação da ferramenta molecular trouxe uma nova abordagem nos estudos cladísticos e se mostrou eficiente por corroborar arranjos estabelecidos previamente por dados

morfológicos e revelar relações inéditas que não puderam ser inferidas anteriormente. Acreditamos que o panorama atual fornece uma nova perspectiva de estudo, indicando novas abordagens a serem investigadas e testadas por estudos morfológicos mais robustos e específicos, como, por exemplo, avaliar a relação proposta de *Pristocerinae* como grupo-irmão de *Epyrinae*+(*Scleroderminae*+*Mesitiinae*), assim como, de maneira inédita, avaliar a relação de *Scleroderminae* e *Mesitiinae*.

Origem e diversificação de Bethylidae

A distribuição atual da família *Bethylidae* é cosmopolita e a maior diversidade de espécies ocorre nas regiões tropicais do planeta (Azevedo, 2006). Para a região Neotropical, são registrados 28 gêneros e cerca de 850 espécies. Na região Afrotropical (Etiópica) foi registrada a ocorrência de 38 gêneros (Mugrabi & Azevedo, 2010). São listados 40 gêneros com ocorrência na região oriental (Terayama, 2003b; Argaman, 2003). Terayama (2003b) lista a ocorrência de 36 gêneros para região Paleártica e 22 para região Neártica. Para a região da Austrália, são citados 19 gêneros (Azevedo, 2006), sendo que Gordh & Móczár (1990) listaram 48 espécies válidas, a maioria delas endêmica.

É provável que a distribuição atual de *Bethylidae* e o arranjo entre as subfamílias reflitam sua distribuição inicial. Vários grupos taxonômicos com distribuição nas regiões ao sul do globo têm sido considerados bons candidatos a possuírem um histórico de vicariância concordante com o histórico das placas tectônicas (Jardine & McKenzie, 1972; revisado em Cranston, 2005). De acordo com Brothers (2011) é possível supor que as famílias mais basais de *Chrysidoidea* tiveram distribuição Gondwanica, uma vez que as reconstruções paleogeográficas mostram que a América do Sul, Antártica, Austrália e Índia-Madagascar permaneceram ligadas na maior parte do Cretáceo tardio até pelo menos 80 m.a.a. (Hay *et al.*, 1999).

A partir dos fósseis encontrados de *Lancepyrinae* e *Scleroderminae* (Azevedo & Azar, 2012; Evans, 1973), é possível supor que, no Cretáceo superior já havia ocorrido a divisão entre as duas principais linhagens de *Bethylidae*: uma linhagem *lepidopterophagous*, que parasita microlepidópteros (*Bethylinae*) e outra *coleopterophagous*, que parasita coleópteros (demais subfamílias) (Azevedo & Azar, 2012; Carr *et al.*, 2010). Dada a retenção das características plesiomórficas de *Bethylinae*, imaginava-se que essa subfamília tivesse a origem mais antiga em relação às demais subfamílias. Através da datação com o relógio molecular, nossas análises indicam a separação de *Chrysididae* e *Bethylidae* por volta de 139 m.a.a, com a divisão de *Bethylidae* nas duas linhagens principais há 131 m.a.a.

Origem e dispersão da linhagem lepidopterophagous

A linhagem dos membros vivos de Bethylinae, surpreendentemente, foi observada como tendo uma origem recente (~63 m.a.a.), corroborando com a datação dos fósseis mais antigos encontrados para a subfamília no período Eoceno, com 56 m.a.a (Sorg, 1988). Desse modo, nossos dados permitem afirmar que os membros vivos de Bethylinae tiveram origem recente, apesar de pertencerem a uma linhagem que se separou das demais subfamílias no começo da diversificação de Bethylidae. Provavelmente os membros mais antigos dessa subfamília foram extintos.

Pelo histórico de distribuição da subfamília, é possível apontar a região da Antártica como palco de grande parte da extinção de Bethylinae. Nossas análises apontam o centro de origem de Bethylidae há ~139 m.a.a em uma área que compreendia Austrália e Índia-Madagascar. A separação das duas principais linhagens de Bethylidae deve ter ocorrido no mesmo cenário, uma vez que nossos dados apontam a separação das duas linhagens iniciais logo em seguida (há ~131 m.a.a).

Pelos dados de distribuição atual que envolve os gêneros mais basais *Lytopsenella* e *Eupsenella* propomos que a linhagem ancestral de Bethylinae se dispersou mais ao sul da Austrália, alcançando a América do Sul provavelmente pela Antártica. Ao mesmo tempo, a linhagem que daria origem às demais subfamílias se expandiu na direção norte, ocupando posteriormente a África e a Arábia.

Parece sugestivo que a linhagem de Bethylinae que parasita microlepidópteros não tenha sido tão bem sucedida quanto à linhagem que parasita coleópteros, que se expandiu rumo à África e Oriente. Além de possuir poucos gêneros e gêneros com poucas espécies, Bethylinae possui uma distribuição bem restrita quando comparada às outras subfamílias.

Dos sete gêneros de Bethylinae, cinco apresentam distribuição restrita. *Eupsenella* (45 espécies) é endêmico da Austrália (Ramos & Azevedo, 2012). Os gêneros *Prosierola* Kieffer, 1905 (seis espécies) e *Lytopsenella* (duas espécies viventes) são restritos ao Novo Mundo (Terayama, 1995a; Azevedo, 2009) e *Bethylus* Latreille, 1802 (33 espécies) ocorre somente na região Holártica (Terayama, 2004). O gênero *Odontepyrus* Kieffer, 1904 (34 espécies) ocorre principalmente na região oriental, com algumas poucas espécies registradas na região Etiópica e Paleártica (Xu & He, 2006). Somente dois gêneros obtiveram maior sucesso: *Goniozus* que possui 170 espécies com distribuição mundial (Lim & Lee, 2012) e *Sierola* que apresenta aproximadamente 200 espécies descritas, devido à irradiação muito recente que ocorreu no Havaí (Gordh, 1998).

Como demonstrado, *Eupsenella* e *Lytopsenella* são gêneros correlatados, sendo o primeiro endêmico da Austrália e o segundo endêmico do Chile, típico de uma distribuição disjunta previamente Gondwanica seguido por evento vicariante. Para explicar o evento vicariante entre *Lytopsenella* e *Eupsenella* pode-se resgatar a história de movimento dos continentes Austrália e América do sul.

A Austrália se separou progressivamente da Antártica durante o Palaeógeno, mas permaneceu conectada a este continente até o fim do Eoceno (40–35 m.a.a.), quando esses dois continentes foram separados pelo Mar da Tasmânia (Lawver *et al.*, 1992; Briggs, 1995), que se tornou consideravelmente profundo aproximadamente há 32 m.a.a. (Lawver & Gahagan, 2003). A América do Sul se separou da Antártica depois da abertura da passagem Drake há 35-30.5 m.a.a. (Scotese, 2001; Lawver & Gahagan, 2003). A temperatura durante esse intervalo era muito mais elevada do que a atual e a Antártica deve ter permanecido sem gelo até 34 m.a.a, apresentando uma floresta subtropical-temperada (Dingle & Lavelle, 1998; Thorn & DeConto, 2006). Desse modo pode-se considerar a América do Sul e Austrália como uma única unidade até o Eoceno (~50 m.a.a), com o isolamento da Antártica, todos os ocupantes desse continente se extinguíram, isolando *Lytopsenella* na América do Sul e *Eupsenella* na Austrália.

Origem e dispersão da linhagem coleopterophagous

O surgimento de *Pristocerinae* foi datado no presente estudo em aproximadamente 98 milhões de anos. Essa família é composta atualmente por 800 espécies, porém, a maioria dos 22 gêneros válidos possuem menos de 10 espécies descritas, e os gêneros *Dissomphalus* Ashmead 1893, *Pseudisobrachium* Kieffer, 1904 e *Apenesia* Westwood, 1874 são responsáveis por mais de 600 espécies (Azevedo, 2004) e são os únicos gêneros cosmopolitas de *Pristocerinae* (Azevedo, 2006). Todos os 22 gêneros de *Pristocerinae* ocorrem na região Etiópica ou Oriental, na verdade quase a metade dos gêneros válidos de *Pristocerinae* é restrita à região Etiópica (*Afgoiogfa*; *Afrocer* Benoît, 1983; *Apristocera* Kieffer, 1914; *Prosapenesia* Kieffer, 1910; *Trichiscus* Benoît, 1956, *Kathepyris* Kieffer, 1907 *Diepyris* Benoît, 1957, *Dicrogenium* Stadelmann, 1894, *Neodicrogenium* Benoît, 1957 e *Usakosia* Kieffer, 1914) e Oriental (*Caloapenesia* Terayama, 1995; *Foenobethylus*; *Neoapenesia* Terayama, 1995 e *Scaphepyris* Lanes & Azevedo, 2007).

Esses dados de distribuição sugerem que *Pristocerinae* teve o centro de origem na região sudeste do continente Gondwanico, região atualmente da Índia, Madagascar e Arábia. Pela reconstrução biogeográfica indicada pela estimativa de dispersão DIVA, a origem de *Pristocerinae* ocorreu na região Oriental; o clado mais basal da subfamília indicado pelo gene COI é formado pelos gêneros *Gênero nov.* e *Caloapenesia* que possui ocorrência restrita a região oriental; o clado que emerge a seguir é formado por gêneros com distribuição africana e

ou oriental, em concordância com a estimativa de DIVA, o que sugere distribuição inicial Afro-oriental para esse clado.

Epyrinae possui 20 gêneros com 761 espécies e descendente da linhagem que se separou de Scleroderminae+Mesitiinae há aproximadamente 100 m.a.a. Sua distribuição, assim como de Pristocerinae, é predominante na Etiópica e Oriental, com 16 gêneros ocorrendo nessas duas áreas, coincidindo com a estimativa de que a área ancestral obtida para a ocupação de Epyrinae era a região Oriental (Índia- Madagascar).

Mesitiinae e Scleroderminae: confirmando uma relação inusitada

Mesitiinae apresentam padrão de distribuição único em Bethylidae, não ocorrem nas regiões do Novo Mundo e na Austrália, e sua diversidade genérica ocorre na região Paleártica. Morfologicamente, Mesitiinae são bastante característicos e pouco diversos. Devido a essas peculiaridades alguns autores já suspeitavam de uma origem recente. Carr *et al.* (2010) sugerem a origem para a subfamília após a abertura do oceano Atlântico e Terayama (2003b) sugere que os membros de Mesitiinae tiveram origem recente dentre as subfamílias de Bethylidae.

Nossos resultados corroboram a estimativa para uma origem recente de Mesitiinae. Quando analisados os genes em separado, Scleroderminae aparecem como parafilética em relação aos Mesitiinae. É possível, portanto, que Mesitiinae tenham se originado de um estoque de Scleroderminae, em um período recente entre 20-40 m.a.a e por terem acumulado inúmeras autapomorfias em um pequeno período de tempo, aparentam pertencer a uma linhagem distinta.

O clado formado por Scleroderminae + Mesitiinae foi estimado em nossas análises como se originando há aproximadamente 94 m.a.a, os representantes vivos de Scleroderminae com origem estimada há 89 m.a.a e os membros de Mesitiinae compartilharam um ancestral comum mais recente por volta de 45 m.a.a. Através da análise de reconstrução biogeográfica foi estimada uma distribuição inicial para o ancestral compartilhado por Scleroderminae e Mesitiinae na região Oriental +Africana e uma origem recente de Mesitiinae, quando os continentes ocupavam posições similares à da atualidade, tornando possível a dispersão para a região Paleártica.

Estimativas de tempo de divergência e associação dos eventos de cladogênese com a biogeografia histórica foram realizadas de forma inédita no presente estudo e trouxeram novas contribuições para o entendimento dos eventos que levaram à distribuição atual para os membros da família Bethylidae. A história da diversificação de Bethylinae concorda com o histórico de separação dos continentes, e corrobora a ideia de distribuição inicial de Chrysidoidea no continente Gondwanico, como previamente proposto por Brothers (2011).

Os dados sobre distribuição geográfica atual, associados com o tempo de divergência das subfamílias apontam novos questionamentos, e requerem novas abordagens de estudo. É

sabido que a relação entre o parasitóide e o hospedeiro pode influenciar a abundância do primeiro. Em Chrysidoidea, por exemplo, das aproximadamente 8.000 espécies, 5.200 são referentes à Bethylidae e Chrysididae (Davis *et al.*, 2010). Membros de Bethylidae, parasitam Lepidoptera e Coleoptera, enquanto Chrysididae parasitam primariamente outros Hymenoptera e Lepidoptera. Os grupos de hospedeiros Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera, por sua vez, são muito mais especiosos quando comparados com os hospedeiros de outras famílias de Chrysidoidea, como Sclerogibbidae que parasitam Embioptera, e Dryinidae e Embolemidae que parasitam Hemiptera.

Tomando essa linha de pensamento, em uma escala menor, surgem alguns questionamentos, como se o modo de vida do parasita estaria associado com o sucesso evolutivo de alguns clados de Bethylidae; ou ainda se alguns clados seriam especialistas na escolha de seus hospedeiros. Com a datação obtida nesse estudo, pode-se avançar no conhecimento e questionar por que gêneros que surgiram há vários milhões de anos, com a possibilidade de grande diversificação (como por exemplo, *Caloapenesia*) são restritos a poucas espécies e pequenas regiões do globo, enquanto gêneros recentes (como por exemplo, *Goniozus* e *Sierola*) sofreram uma enorme radiação.

Acreditamos dessa maneira que nosso trabalho trouxe contribuição para o entendimento das relações filogenéticas e auxiliaram no entendimento da origem e diversificação de Bethylidae e finalmente forneceu um novo panorama, no qual novos estudos devem ser elaborados para compreender os mecanismos evolutivos de um grupo de organismos com um papel fundamental na manutenção do ecossistema terrestre.

Amplificando e sequenciando genes em Bethylidae

No presente estudo, para obter uma amostragem significativa dos gêneros a serem utilizados nas análises, foi necessário utilizar exemplares depositados em coleções entomológicas, a partir de espécimes desidratados e preparados em alfinetes, alguns preparados há mais de 20 anos.

É consenso que o tempo e as condições de armazenamento influenciam na qualidade do DNA obtido, quanto mais velho e seco o espécime, maior a degradação do DNA (Van Houdt *et al.*, 2010). Esse tipo de material armazenado em via seca gera outro tipo de dificuldade na amplificação do DNA via PCR, pois o DNA das amostras é contaminado por DNA de fungos, pragas de coleção ou humano devido à contaminação pelo manuseamento (Champlot *et al.*, 2010; Andersen & Mills 2012).

Além do baixo sucesso na amplificação da amostra devido à qualidade do DNA, observamos contaminações do DNA alvo com outros DNAs provenientes do processo de coleta, preparação, manuseio e conservação dos espécimes, confirmado pela amplificação de DNA de

outros organismos, tais como o da praga de coleção *Liposcelis bostrychophila*, do fungo da espécie *Aspergillus niger* e de *Homo sapiens*.

Outro agravante no processo de amplificação do DNA de nossas amostras ocorreu pela amplificação cruzada de DNAs provenientes da bactéria pertencente ao gênero *Wolbachia* e de restos do outros organismos considerados hospedeiros do parasitóide.

A amplificação com *Wolbachia* é um problema recorrente quando se usa *primers* universais para amplificar gene COI (Smith *et al.*, 2012). Estima-se que essa bactéria endossimbionte esteja presente em 66% de todos os artrópodes (Hilgenboecker *et al.*, 2008). De acordo com Stouthamer *et al.* (1990), bactérias desse gênero são capazes de alterar a razão sexual em himenópteros infectados.

Naturalmente vespas parasitóides se reproduzem sexualmente gerando fêmeas; ou por partenogênese gerando machos. A bactéria *Wolbachia* induz as vespas a se reproduzirem por partenogênese telítoca, com nascimento apenas de fêmeas (Plantard *et al.*, 1998). Em programas de controle de pragas o uso de populações telíticas reduz os custos de produção do agente, pois não há produção de machos, o que facilita o estabelecimento dos parasitóides no campo sem necessidade de cópula.

A confirmação da infecção de populações de vespas parasitóides pode ser feita através da detecção do DNA da bactéria através de PCR (Ciociola Jr *et al.*, 2001). No presente trabalho foi possível verificar a infecção de vários gêneros de Bethyidae pela bactéria *Wolbachia* de forma inédita.

A amplificação cruzada com hospedeiros de vespas parasitóides tem sido relatado por alguns autores (Lee & Lee, 2012; Rcek *et al.*, 2011). Rougerie *et al.* (2011) demonstram o potencial da identificação de hospedeiros através da técnica de código de barras de DNA (*DNA barcoding*), ressaltando que insetos que sofrem metamorfoses possuem um modo de vida complexo e desconhecido. Geralmente não se sabe do que as larvas se alimentam, e esse tipo de conhecimento requer um trabalho de campo e laboratorial intensivo. Desconhecer os hospedeiros de vespas parasitóides pode ser um entrave para o uso do grupo no controle de pragas agrícolas.

No presente trabalho foi possível fazer algumas associações parasita-hospedeiro, tais como os gêneros de Bethyinae *Lytopsenella* Kieffer, 1905 e *Sierola* Cameron, 1881 com lepidópteros pertencentes à superfamília Geometroidea. O gênero *Eupsenella* Westwood, 1874 foi associado repetidamente com outros Hymenoptera. A sequência de sete exemplares, tanto com o gene COI tanto com o gene rDNA 28S, quando submetidos a ferramenta BLAST apresentavam alta similaridade com o gênero *Apis* Linnaeus, 1758. Apesar da possibilidade da presença do DNA de *Apis* presente em *Eupsenella* ser resultado de outro tipo de contaminação, há de se considerar que existe um forte indício de que *Eupsenella* possa parasitar outros himenópteros, ao invés de lepidópteros.

Existem alguns registros anômalos na literatura em que membros de Bethylinae aparecem emergindo de hospedeiros diferentes das usuais larvas de lepidópteros tornando nossa hipótese plausível. O gênero *Goniozus* Förster 1856, por exemplo, já foi associado em outros estudos a hospedeiros como besouro da família Anobiidae (Richards, 1955), díptero da família Cecidomyiidae (Kurian, 1952) e vespa da família Sphecidae (Melo & Evans, 1993). Membros das demais subfamílias de Bethylidae também foram relacionados a hospedeiros incomuns em condições experimentais tais como abelhas, vespas e formigas (Polaszek & Krombein, 1994).

Devido às peculiaridades de nossa amostra, causadas por problemas de contaminação e baixa qualidade do DNA relatadas acima, em várias ocasiões utilizamos *primers* internos alternativos que amplificavam fragmentos pequenos, quando o DNA se encontrava degradado, e *primers* mais específicos, para evitar contaminações cruzadas. A nossa taxa de sucesso na obtenção das sequências ficou em torno de 25%, fazendo-se necessário o processamento de um grande número de espécimes para se chegar à sequência viável de 111 exemplares.

Escolha dos marcadores

Os primeiros trabalhos com filogenética envolvendo Hymenoptera utilizaram tradicionalmente os genes mitocondriais 16S rDNA e COI e o gene nuclear 28S rDNA. Os genes mitocondriais 16S rDNA e COI são empregados com frequência em análises filogenéticas envolvendo membros de Apoidea e Chrysidoidea para resolver parentesco entre famílias e gêneros (Dowton & Austin, 1998; Mardulyn & Whitfield, 1999; Chen *et al.*, 2004; Michel-Salzat *et al.*, 2004; Niehuis & Wägele, 2004; Castro & Dowton, 2006; Carr *et al.*, 2010; Debevec *et al.*, 2012).

Genes mitocondriais sabidamente evoluem em uma taxa mais alta do que genes nucleares. Em insetos, estima-se que genes mitocondriais evoluam de 2 a 9 vezes mais rápido do que genes nucleares codificadores de proteínas (DeSalle *et al.*, 1987; Monteiro & Pierce, 2001; Moriyama & Powell, 1997).

Altos níveis de divergência em genes mitocondriais foram encontrados dentro de Hymenoptera, em trabalhos que obtiveram sucesso em recuperar relações filogenéticas inter e intragenéricas (Stone & Cook, 1998; Nyman *et al.*, 2000) e também relações intraespecíficas (Rokas *et al.*, 2000). Rokas *et al.* (2001) tentando definir marcadores apropriados para filogenia molecular em insetos encontraram altos níveis de divergência para o gene COI em Cynipidae, chegando a 40%, enquanto que o gene 28S rDNA apresentou divergência de 8,5%. As divergências genéticas encontradas no presente estudo para os genes mitocondriais em Bethylidae, foi de 12-34% e 20-44% para o gene 16S rDNA e COI, respectivamente, e de 3-15% para o gene nuclear 28S rDNA, corroborando a evolução mais lenta do gene nuclear em relação ao mitocondrial.

É válido ressaltar que um marcador com evolução rápida pode se tornar saturado de mutações no decorrer do tempo devido ao efeito de substituições múltiplas no mesmo *locus* e se tornar um marcador ineficiente para estimar filogenia.

Marcadores de evolução rápida são bem menos úteis ao se tentar recuperar filogenias com níveis hierárquicos superiores (linhagens que divergiram a mais de 50 m.a.a.) tanto em Hymenoptera (Belshaw & Quicke, 1997; Rokas *et al.*, 2001) quanto em outros insetos (Howland & Hewitt, 1995).

Quando genes mitocondriais são utilizados associados com genes nucleares, geralmente se observa que genes nucleares apresentam um poder de resolução maior (principalmente em níveis taxonômicos superiores) e valores de suporte maiores para os clados, quando comparado com genes mitocondriais (Morris *et al.*, 2002; Reed & Sperling, 1999). De maneira geral é aconselhado em estudos filogenéticos o uso de alinhamentos concatenados utilizando pelo menos dois genes (Gadagkar *et al.*, 2005), obtendo maior acurácia nas inferências filogenéticas e evitando possíveis diferenças entre árvores de genes e árvores de espécies.

Himenópteros, em especial, possuem composição nucleotídica com alto viés para um conteúdo rico em A-T (Crozier & Crozier, 1993; Dowton & Austin, 1995; Whitfield & Cameron, 1998). O viés A-T reduz de quatro estados de caracteres (A, C, G, ou T) para praticamente dois estados de caracteres (A ou T). O resultado é que esses sítios A-T se tornam saturados mais rapidamente do que outros sem esse viés.

No presente trabalho, os genes mitocondriais das espécies de Bethylidae apresentaram uma alta frequência de A-T, tanto para o gene COI (73,13%) quanto para o gene 16S rDNA (80,54%). O gene 28S rDNA, por sua vez, apresentou uma frequência bem menor, com 40% na composição das bases para o conteúdo A-T. Essas taxas de composição nucleotídica obtida é comparável com os dados de Dowton & Austin (1995) para os genes COI e 16S rDNA, que também mostraram alto conteúdo de bases A-T com 74.0% e 81.9%, respectivamente. A composição nucleotídica baixa encontrada para o gene 28S rDNA está de acordo com a ideia de que esse gene não apresenta um viés para um rico conteúdo de A-T não sendo, portanto, influenciado por altas frequências de homoplasias (Rokas *et al.*, 2001).

O gene nuclear 28S rDNA é frequentemente utilizado por vários autores para a reconstrução filogenética envolvendo relações entre táxons superiores como tribo e família (Dowton & Austin, 1998; Gaultier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Carr *et al.*, 2010; Heraty *et al.*, 2011). O maior desafio ao se trabalhar com genes ribossomais, entretanto, ocorre no alinhamento das sequências, devido à presença de regiões com várias alças, tornando necessária a consideração da estrutura secundária do RNA para evitar comparações entre regiões que não são homólogas.

No trabalho envolvendo dados moleculares de Bethylidae realizado por Carr *et al.* (2010) foram utilizadas sequências dos genes 16S rDNA e 28S rDNA, pertencentes a 18

gêneros de Bethylidae. Porém os autores não encontraram suporte para estabelecer as relações entre as subfamílias. Essa falta de resolução deve-se, principalmente, à escolha dos marcadores e à quantidade de genes utilizados.

Em sua análise, Carr e colaboradores verificaram que a árvore gerada exclusivamente com o gene 16S rDNA apresentou uma resolução muito pobre, sendo quase desprovida de informação, exceto pela recuperação de Bethylinae como um grupo monofilético. A árvore gerada com dados do gene 28S rDNA, por outro lado, é bem mais robusta, sendo possível recuperar a monofilia de Bethylidae, das subfamílias e determinar a posição de Bethylinae em relação as demais. Ao se concatenar os dois genes não se obteve nenhuma informação adicional além dessas citadas para o 28S rDNA, evidenciando a pouca contribuição do gene 16S rDNA na análise.

No presente estudo, o gene COI se mostrou bastante informativo, recuperando a monofilia de Bethylinae, Pristocerinae e Mesitiinae, enquanto o gene 16S rDNA contribuiu exclusivamente para confirmar a monofilia de Bethylinae. O gene 28S rDNA foi o mais informativo, recuperando a monofilia de Bethylidae e de todas as subfamílias, exceto Scleroderminae.

Somente com a análise com os três genes concatenados tornou-se possível recuperar as relações entre todas as subfamílias.

A incorporação da ferramenta molecular em Bethylidae é uma realidade recente, e a incorporação de novos marcadores na sistemática desse grupo sem dúvidas auxiliará no entendimento da evolução de um grupo tão diverso e de importância ecológica.

REFERÊNCIAS

- Alencar IDCC & Azevedo CO (2013) Reclassification of Epyrini (Hymenoptera: Bethylidae): a tribal approach with commentary on their genera. *Systematic Entomology*, 38: 45-80.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1997) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Andersen JC & Mills NJ (2012) DNA extraction from museum specimens of parasitic Hymenoptera. *PLoS ONE*, 7: e45549.
- Argaman Q (1988) A new subfamily of Bethylidae allied to Pristocerinae (Hymenoptera). *Società Entomologica Italiana*, 120: 139-152.
- Argaman Q (2003) Generic synopsis of Mesitinae Kieffer, 1914 (Hymenoptera: Bethylidae). *Entomofauna*, 24: 61-96.
- Azevedo CO & Guimarães BH (2006) Insecta, Hymenoptera, Bethylidae: range extension and filling gaps in Yemen. *Check List*, 2: 26-29.
- Azevedo CO & Lanes GO (2009) Cladistic assessment and redescription of *Galodoxa torquata* Nagy (Hymenoptera, Bethylidae), a striking species with swallow tailed metasomal sternite. *Zoologische Mededelingen*, 83: 841-851.
- Azevedo CO (2004) A new species of *Caloapenesia* from Vietnam, with discovery of the female of the genus. *Spixiana*, 27: 143-146.
- Azevedo CO (2006) Insecta, Hymenoptera, Bethylidae: range extension and filling gaps in Australia. *Check List*, 2: 42-44.
- Azevedo CO (2009) Synopsis of *Lytopsenella* Kieffer (Hymenoptera: Bethylidae) *Zootaxa*, 2286: 58-64.
- Azevedo CO & Azar D (2012) A new fossil subfamily of Bethylidae (Hymenoptera) from the Early Cretaceous Lebanese amber and its phylogenetic position. *Zoologia*, 29: 210-218.
- Belshaw R & Quicke DLJ (1997) A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 81-293.
- Berland L (1928) Bethylidae. Faune de France 19- Hyménoptères Vespiformes II. Office Central de Fannistique, Paul Lechevalier, Paris, pp. 96-137.

- Brady SG, Larkin L & Danforth BN (2009) Bees, ants, and stinging wasps (Aculeata). *The time tree of life* (ed by Hedges SB & Kumar S), Oxford University Press, New York. pp. 264-269.
- Briggs JC (1995) *Global biogeography*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Brothers DJ & JM Carpenter (1993) Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 2: 227-304.
- Brothers DJ (1975) Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. *The University of Kansas Science Bulletin*, 50: 483-648.
- Brothers DJ (1999) Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*, 28 (1-2): 233-250.
- Carolan JC, Murray TE, Fitzpatrick Ú, Crossley J & Schmidt H (2012) Colour Patterns Do Not Diagnose Species: Quantitative Evaluation of a DNA Barcoded Cryptic Bumblebee Complex. *PLoS ONE* 7: e29251.
- Carpenter JM (1986) Cladistics of the Chrysidoidea (Hymenoptera). *Journal of the New York Entomological Society*, 94: 303-330.
- Carpenter JM (1999) What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationship? *Zoological Scripta*, 28: 215-232.
- Carr M, Young JP & Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethyidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics and Evolution*, 41: 55-73.
- Castro LR & Dowton M (2006) Molecular analyses of the Apocrita (Insecta: Hymenoptera) suggest that the Chalcidoidea are sister to the diaprioid complex. *Invertebrate Systematics*, 20: 603-614.
- Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, *et al.* (2010) An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLoS ONE*, 5: e13042.
- Chen Y, Xiao H, Fu J & Huang D (2004) A molecular phylogeny of eurytomid wasps inferred from DNA sequence data of 28S, 18S, 16S, and COI genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 300-307.
- Ciociola Jr AI, Alemida RP, Zucchi RA & Stouthamer, R (2001) Detecção de Wolbachia em uma População Telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o Primer Específico wsp. *Neotropical. Entomology*, 30: 489-491.

- Cockerell TDA (1917) New Tertiary Insects. *Proceedings of the United States National Museum*, 52: 373-384.
- Cockerell TDA (1920) Fossil arthropods in the British Museum. I. *Annals Magazine of the Natural History of London*, 9: 273-279.
- Cranston PS (2005) Biogeographical history. *The evolutionary biology of flies* (ed by Yeates DK. & Wiegmann BM), Columbia University Press, New York, pp. 274-311.
- Crozier RH & Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 113: 97-117.
- Debevec AH, Cardinal S & Danforth BN (2012) Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea. *Zoologica Scripta*, 41: 527-535.
- Dowton M & Austin AD (1994) Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 9911-9915.
- Dowton M & Austin AD (1995) Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 958-965.
- Dowton M & Austin AD (1997) The evolution of strand-specific compositional bias. A case study in the hymenopteran mitochondrial 16SrRNA gene. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 109-112.
- Dowton M & Austin AD (1998) Phylogenetic Relationships among the Microgastroid Wasps (Hymenoptera: Braconidae): Combined Analysis of 16S and 28S rDNA Genes and Morphological Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10: 354-366.
- Drummond AJ & Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969-1973.
- Engel MS & Grimaldi DA (2006) The first Cretaceous sclerogibbid wasp (Hymenoptera: Sclerogibbidae). *American Museum Novitates*, 3515: 1-7.
- Evans HE (1964) A synopsis of the American Bethylidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 132: 1-222.
- Evans HE (1973) Cretaceous Aculeata wasps from Taimyr, Siberia (Hymenoptera). *Psyche*, 80: 166-178.

- Finnamore AT & Brothers DJ (1993) Chrysidoidea, (ed by Goulet H. & J. T. Huber JT), *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Public Works Government Services, Ottawa, Canada, pp.133-136.
- 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.
- Fouts R (1936) Check list of the Serphoid. *Systematic Biology*, 46: 195-203.
- Gadagkar SR, Rosenberg MS, Kumar S (2005) Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Molecular Development Evolution*, 304: 64-74.
- Gauld I & Bolton B (1988) The Hymenoptera, Vol. XI. Oxford University Press, Oxford, pp.1-331.
- Gauthier N, Lasalle J, Quicke DLJ & Godfray HCJ (2000) Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids. *Systematic Entomology*, 25: 521-539.
- Gordh G & Móczár L (1990) A catalog of the world Bethylidae (Hymenoptera: Aculeata). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 46:1-364.
- Gordh G (1998) A new species of *Sierola* parasitic on moth larvae in Western Australia (Hymenoptera: Bethylidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 33: 83-88.
- Hanson PE & Gauld ID (1995) The Hymenoptera of Costa Rica: Oxford University Press, pp. 893.
- Hay WW (and 10 others) (1999) Alternative global Cretaceous paleogeography. *Geological Society of America Special Paper*, 332: 1-48.
- Heraty JM, Ronquist F, Carpenter JM, Hawaks D, Schulmeister S, Dowling PA, Murray D, Munro J, Wheeler CW, Schiff N & Sharkey M (2011) Evolution of the hymenopteran megaradiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 73-88.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A & Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 215-220.
- Howland DE & Hewitt GW (1995) Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Molecular Biology*, 4: 203-215.

- Jardine N & McKenzie D (1972) Continental drift and the dispersal and evolution of organisms. *Nature*, 235: 20-24.
- Katoh K, Asimenos G & Toh H (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis Methods in Molecular Biology* (ed by Posada D) Humana Press, New York, pp. 537.
- Kieffer JJ (1908) Bethylidae. *Genera Insectorum*, 76: 1-50.
- Kieffer JJ (1914) Bethylinae. *Das Tierreich*, 41: 228-595.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kurian C (1952) Descriptions of four new and record of one known Bethyloidea (Parasitic Hymenoptera) from India. *Agra University Journal of Research*, 1: 63-72.
- Lanes GO & Azevedo CO (2008) Phylogeny and Taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylidae, Epyrinae). *Insect Systematics and Evolution*, 39: 55-86.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948
- Lawver LA & Gahagan LM (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 198: 11-37.
- Lawver LA, Gahagan LM & Coffin MF (1992) The development of paleoseaways around Antarctica. *The Antarctic paleoenvironment: a perspective on global change* (ed by Kennett JP & Warnke DA) American Geophysical Union, Washington, pp. 7-30.
- Lee W & Lee S (2012) Unexpected problem in aphid DNA barcoding by universal primers. *Entomological Science*, 15: 121-126.
- Lim J & Lee S (2012) Review of *Goniozus* Förster, 1856 (Hymenoptera: Bethylidae) of Korea, with descriptions of two new species. *Zootaxa*, 3414: 43-57.
- Macek J, Strejček J & Straka J (2007) Chrysidoidea: Bethylidae (hbitěnkovití) (ed by Bogusch P, Straka J & Kment P) *Acta Entomologica*, pp. 21-40.
- Mardulyn P & Whitfield JB (1999) Phylogenetic signal in the COI, 16S and 28S genes for inferring relationships among the genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): Evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 282-294.

- Melo G & Evans HE (1993) Two new *Microstigmus* species (Hymenoptera, Sphecidae), with the description of their parasite, *Goniozus microstigma*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 95: 258-263.
- Michel-Salz A, Cameron SA & Oliveira ML (2004) Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 309-323.
- Monteiro A, Pierce NE (2001) Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1a gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18: 264-281.
- Moriyama EN & Powell JR (1997). Synonymous substitution rates in *Drosophila* mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 378-391.
- Morris DC, Schwarz MP, Cooper SJB, Mound LA (2002) Phylogenetics of Australian Acaciathrips: the evolution of behaviour and ecology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 278-292.
- Mugrabi DF & Azevedo CO (2010) Insecta, Hymenoptera, Bethylidae: Range extension and filling gaps in Madagascar. *Check List*, 6: 62-63.
- Nagy CG (1974) A new bethylid subfamily allied to Protopristocerinae. *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, 106: 126-130.
- Niehuis O & Wägele J (2004) Phylogenetic analysis of the mitochondrial genes LSU rRNA and COI suggests early adaptive differentiation of anal teeth in chrysidine cuckoo wasps (Hymenoptera: Chrysididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 615-622.
- Nyman T, Widmer A & Roininen H (2000) Evolution of gall morphology and host-plant relationships in willow-feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution*, 54: 526-533.
- Ortega-Blanco J, Delclòs X & Engel MS (2011) The wasp family Embolemidae in Early Cretaceous amber from Spain (Hymenoptera: Chrysidoidea). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 84: 36-42.
- Pedersen BV (1996) A phylogenetic analysis of cuckoo bumblebees (*Psithyrus*, Lepeletier) and bumblebees (*Bombus*, Latreille) inferred from sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 289-297
- Plantard O, Jean-Yves R, Mondor G, Le Clainche I & Solignac M (1998) *Wolbachia*–induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissima* (Giraud) (Hymenoptera:

- Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 265: 1075-1080.
- Polaszek A & Krombein KV (1994) The genera of Bethylinae (Hymenoptera, Bethylidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 3: 91-105.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.
- Rambaut A & Drummond AJ (2007) Tracer v1.4. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos SM & Azevedo CO (2012) Revision of *Eupsenella* Westwood, 1874 (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 3539: 1-80.
- Rasnitsyn AP (2010) Molecular phylogenetics, morphological cladistics, and fossil record. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 89: 85-132. [In Russian; English translation in Entomological Review, 90: 263-298].
- Rcek J, Miller SE, Quicke DLJ & Smith MA (2011) Molecular detection of trophic links in a complex insect host–parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources*, 11: 786-794.
- Reed RD & Sperling FA (1999). Interaction of process partitions in phylogenetic analysis: an example from the swallowtail butterfly genus *Papilio*. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 286-297.
- Richards OW (1955) On the Bethyloidea (Hymen.) of Israel. *Bulletin of the Research Council of Israel*, 4: 357-359.
- Rokas A, Nylander JAA, Ronquist F & Stone GN (2002) A Maximum-Likelihood Analysis of Eight Phylogenetic Markers in Gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): Implications for Insect Phylogenetic Studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 206-219.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Ronquist F (1997) Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, 46: 195-203.
- Ronquist F (1999) Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. *Zoologica Scripta*, 28(1-2): 3-11.
- Rougerie R, Smith MA, Fernandez-Triana J, Lopez-Vaamonde C, Ratnasingham S & Hebert PDN (2011) Molecular analysis of parasitoid linkages (MAPL): gut contents of adult parasitoid wasps reveal larval host. *Molecular Ecology*, 20: 179-186.

- Scotese CR (2001) Digital paleogeographic map archive on CD-ROM. PALEOMAP Project, Arlington, TX.
- Smith MA, Bertrand C, Crosby K, Eveleigh ES, Fernandez-Triana J, et al. (2012) *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential and Problems. *PLoS ONE*, 7: e36514.
- Sorg M (1988) Zur Phylogenie und Systematik der Bethylidae (Insecta: Hymenoptera: Chrysidoidea). *Sonderveröffentlichungen des Geologischen Institut der Universität zu Köln*, 63: 1-146.
- Stamatakis A, Hoover P & Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology*, 75: 758-771.
- Stone KD & Cook JA (1998) Molecular evolution and colonization history of the holarctic genus *Martes*. Presented at: Euro-American Mammal meeting in Santiago de Compostela, Spain.
- Stouthamer R, Luck RF & Hamilton WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 2424-2427.
- 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*, 28: 2731-2739.
- Terayama M (1996) The phylogeny of the bethylid wasp subfamily Pristocerinae (Hymenoptera: Bethylidae). *Japanese Journal of Entomology*, 64: 587-601.
- Terayama M (2003a) Phylogenetic systematic of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera). Part I. Higher classification. Academic Reports. *The Faculty of Engineering, Tokyo Polytechnic University*, 26: 1-15.
- Terayama M (2003b) Phylogenetic systematic of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera). Part II. Keys to subfamilies, tribes and genera in the world. Academic Reports. *The Faculty of Engineering, Tokyo Polytechnic University*, 26: 16-29.
- Terayama M (2004) Descriptions of new taxa and distribution records of the family Bethylidae (Insecta, Hymenoptera). II. Subfamily Bethylinae and fossil taxa. *Academic Reports, Faculty of Engineering Tokyo Polytechnic University*, 27: 39-52.
- Terayama M (2006) *The Insects of Japan. Bethylidae (Hymenoptera)*. Touka Shobo Fukuoka, pp. 1-319.
- Thomsen PF, Elias S, Gilbert MTP, Haile J, Munch K, et al. (2009) Non-destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS ONE*, 4: e5048.

- Van Houdt JKJ, Breman FC, Virgilio M & De Meyer M (2010) Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 10: 459-465.
- Várkonyi G & Polaszek A (2007) Rediscovery and revision of *Foenobethylus* Kieffer, 1913 (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 1546: 1-14.
- Whitfield JB & Cameron SA (1998) Hierarchical analysis of variation in the 16S rRNA gene among Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1728-1743.
- Xia X & Xie Z (2001) "DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution." *Journal of Heredity*, 92: 371-373.
- 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.
- Xu Z & He J (2006) three new species of the genus *Odontepyrus* from China (Hymenoptera: Bethylidae). *Entomological News*, 117: 47-52.

Anexo 2.1.

Espécimes de Bethylidae utilizados no presente estudo, com destaque nos genes analisados por indivíduos: citocromo oxidase I (COI) e 28S (28S rRNA).

Família: Subfamília ¹	Gênero	Espécie	Fonte ²	16S rRNA	COI	28S rRNA
Bethylidae: Bethylineae (7)	<i>Bethylus</i>	<i>B. fusciformes</i>	Doc 259	-	Y	-
		<i>B. cephalotes</i>	GenBank	GU213917	-	GU213939
		<i>B. fuscicornes</i>	GenBank	-	-	GU213940
	<i>Eupsenella</i>	<i>E. insulana</i>	Doc 250	-Y	Y	
	<i>Goniozus</i>	<i>Goniozus sp.A (strictu sensu)</i>	GenBank	-	-	GU213942
		<i>Goniozus sp.B (strictu sensu)</i>	GenBank	-	-	GU213943
		<i>Goniozus sp.C (strictu sensu)</i>	Doc 394	-	Y	Y
		<i>Goniozus legneri</i>	GenBank	GU213920	-	GU213948
		<i>Goniozus nephantidis</i>	GenBank	GU213921	-	GU213947
		<i>Goniozus sp.D (var. Parasierola)</i>	Doc 392	-	Y	Y
		<i>Goniozus sp.E (var. Parasierola)</i>	Doc 393	-	Y	Y
		<i>Goniozus sp.F (var. Parasierola)</i>	GenBank	GU213919	-	GU213941
	<i>Lytropsenella</i>	<i>L. testaceicornes</i>	Doc 154	Y	-	-
		<i>Lytropsenella sp.</i>	Doc 471	-	Y	
	<i>Odontepyris</i>	<i>Odontepyris bedus</i>	Doc 287	-	-	Y
		<i>Odontepyris sp.A</i>	Doc 435	-	Y	Y
		<i>Odontepyris sp.B</i>	GenBank	-	-	GU213944
		<i>Odontepyris sp.C</i>	GenBank	GU213918	-	GU213945
	<i>Prosierola</i>	<i>Prosierola sp.A</i>	Doc 399	-	Y	Y
		<i>Prosierola sp.B</i>	Doc 397	-	Y	Y
	<i>Sierola</i>	<i>S. cf anthacina</i>	Doc 260	-	Y	Y
		<i>S. concave gena</i>	Doc 261	-	Y	Y
		<i>S. gracile</i>	Doc 262	-	-	Y

Família: Subfamília ¹	Gênero	Espécie	Fonte ²	16S rRNA	COI	28S rRNA
Epyrinae (17)	<i>Anisepyris</i>	<i>A. analis</i>	Doc 301	-	-	Y
		<i>A. amazonicus</i>	Doc 303	-	Y	-
		<i>A. subviolaceus</i>	GenBank	GU213926	-	GU213965
		<i>Anisepyris SP</i>	GenBank	GU213925	-	GU213964
	<i>Bakeriella</i>	<i>Bakeriella sp.A</i>	Doc 295	-	Y	-
		<i>B. erythogasta</i>	Doc 297	-	Y	-
		<i>B. bulbosa</i>	Doc 298	-	Y	-
		<i>Bakeriella sp.B</i>	Doc 398	-	Y	Y
	<i>Disepyris</i>	<i>Disepyris sp.A</i>	Doc 223	-	Y	Y
		<i>Disepyris sp.B</i>	Doc 270	-	-	Y
		<i>Disepyris sp.C</i>	Doc 214			
	<i>Epyris</i>	<i>Epyris sp.A</i>	Doc 300	-	Y	Y
		<i>Epyris sp.B</i>	Doc 115	Y	Y	Y
		<i>Epyris sp.C</i>	GenBank	GU213924	-	GU213969
		<i>Epyris sp.D</i>	GenBank	GU213922	-	GU213967
	<i>Formosiepyris</i>	<i>Formosiepyris sp.</i>	Doc 218	Y	Y	Y
	<i>Holepyris</i>	<i>Holepyris sp.A</i>	A 136	-	Y	Y
		<i>Holepyris sp.B</i>	Doc 229	-		Y
		<i>Holepyris sp.C</i>	Doc 70	Y	Y	Y
		<i>Holepyris sp.D</i>	GenBank	-	-	GU213970
		<i>Holepyris sp.E</i>	Doc 328	-	-	Y
	<i>Trachepyris</i>	<i>Trachepyris sp.A</i>	Doc 117	Y	Y	Y
		<i>Trachepyris sp.B</i>	Doc 225	Y	Y	Y
	<i>Rhabdepyris sp.</i>	<i>Rhabdepyris sp.</i>	GenBank	AJ514326	AJ514364	-
	<i>Laelius</i>	<i>Laelius akares</i>	Doc 152	Y	Y	Y
		<i>Laelius sp.</i>	Doc 156	-	-	Y
		<i>Laelius pedatus</i>	GenBank	-	-	GU213963

Família: Subfamília ¹	Gênero	Espécie	Fonte ²	16S rRNA	COI	28S rRNA
Mesitiinae (22)	<i>Codorcas</i>	<i>Codorcas sp.</i>	Doc 232	-	-	✓
	<i>Clytovorus</i>	<i>Clytovorus sp.</i>	Doc 267	-	-	✓
	<i>Heterocoelia</i>	<i>Heterocoelia sp.A</i>	Doc 157	-	✓	✓
		<i>Heterocoelia sp.B</i>	Doc 158	-	✓	✓
	<i>Metrionotus</i>	<i>Metrionotus sp.A</i>	Doc 161	✓	✓	✓
		<i>Metrionotus sp.B</i>	Doc 162	✓	-	✓
	<i>Mesitius</i>	<i>Mesitius absents</i>	Doc 235	-	✓	✓
	<i>Pilomesitius</i>	<i>Pilomesitius sp.</i>	Doc 246	✓	✓	✓
	<i>Pseudomesitius</i>	<i>Pseudomesitius sp</i>	Doc 386	-	✓	✓
	<i>Sulcomesitius</i>	<i>Sulcomesitius sp.A</i>	Doc 160	-	✓	✓
		<i>Sulcomesitius sp.B</i>	Doc 159	-	-	✓
		<i>Sulcomesitius sp.C</i>	GenBank	GU213923	-	-
	<i>Ukayakos</i>	<i>Ukayakos sp.</i>	Doc 375	-	-	✓
Pristocerinae (22)	<i>Zimankos</i>	<i>Z. shianaka</i>	Doc 271	-	✓	✓
	<i>Itapayos</i>	<i>Itapayos sp.</i>	Doc 272	-	-	✓
	<i>Acrepyris</i>	<i>A. armiferus</i>	Doc 02	-	✓	✓
	<i>Apenesia</i>	<i>Apenesia sp.A</i>	A 163	-	✓	-
		<i>Apenesia sp.B</i>	Doc 131	✓	✓	✓
		<i>A. concavata</i>	Doc 53	✓	✓	-
	<i>Dissomphalus</i>	<i>D. apertus</i>	Doc 346	-	✓	-
		<i>D. plaumani</i>	Doc 354	-	-	✓
		<i>D. vallensis</i>	Doc 366	-	-	✓
		<i>D. curviventris</i>	Doc 360	-	-	✓
		<i>D. unitus</i>	Doc 361	-	-	✓
		<i>D. krombiei</i>	Doc 388	-	-	✓
		<i>D. nanus</i>	Doc 352	-	✓	-
		<i>Dissomphalus sp nv.</i>	Doc 48	✓	✓	✓
		<i>Dissomphalus sp. A</i>	Mada	-	✓	-
	<i>Foenobethylus</i>	<i>F. emiliacasellae</i>	Doc 238	-	-	✓
		<i>F. bidentadus</i>	Doc 242	-	-	✓
	<i>Kathepyris</i>	<i>Kathepyris sp.</i>	Doc 395	-	-	✓
	<i>Parascleroderma</i>	<i>Parascleroderma sp.A</i>	Doc 230	✓	✓	✓
		<i>Parascleroderma sp.B</i>	Doc 263	-	-	✓

Família: Subfamília ¹	Gênero	Espécie	Fonte ²	16S rRNA	COI	28S rRNA
(22) Pristocerinae	<i>Pristocera</i>	<i>Pristocera sp.A</i>	Doc 68	✓	✓	✓
		<i>Pristocera sp.B</i>	Doc 135	-	✓	✓
		<i>Pristocera sp.C</i>	GenBank	GU213916-	-	GQ3747291
		<i>Pristocera sp.D</i>	GenBank	-	-	GU213954
		<i>Pristocera sp.E</i>	Doc 118	✓	✓	✓
	<i>Caloapenesia</i>	<i>Caloapenesia sp.A</i>	A 29	-	✓	-
		<i>Caloapenesia sp.B</i>	A 27	-	✓	-
		<i>Caloapenesia sp.C</i>	Doc 126	✓	-	✓
		<i>Caloapenesia sp.D</i>	Doc 127	✓	-	✓
	<i>Gênero nov..</i>	<i>Gênero nov. sp.</i>	Doc 407	-	✓	-
	<i>Neoapenesia</i>	<i>Neoapenesia sp.</i>	A25	-	✓	-
	<i>Protisobrachium</i>	<i>Protisobrachium sp.A</i>	A 135	-	✓	-
		<i>Protisobrachium sp.B</i>	A 40	-	✓	-
		<i>Protisobrachium sp.C</i>	M184	-	✓	✓
		<i>Protisobrachium sp.D</i>	M22	-	✓	-
		<i>Protisobrachium sp.E</i>	M228	-	✓	-
	<i>Trichiscus</i>	<i>Trichiscus sp.A</i>	A109	-	✓	-
		<i>Trichiscus sp.B</i>	A 120	-	✓	-
		<i>Trichiscus sp.C</i>	M89	-	-	✓
		<i>Trichiscus sp.D</i>	GenBank	-	-	GU213953
	<i>Pseudosobrachium</i>	<i>Pseudosobrachium sp.A</i>	A	-	✓	✓
		<i>Pseudosobrachium sp.B</i>	Doc 69	✓	✓	✓
		<i>P. intertum</i>	Doc 72	✓	✓	✓
		<i>P.plasmai</i>	Doc 85	✓	✓	-
		<i>Pseudosobrachium sp.C</i>	GenBank	-	-	GU213955

Família: Subfamília ¹	Gênero	Espécie	Fonte ²	16S rRNA	COI	28S rRNA
Scleroderminae (21)	<i>Allobethylus</i>	<i>Allobethylus sp.A</i>	Doc 46	Y	-	Y
		<i>Allobethylus sp.B</i>	GenBank	-	-	GU213960
	<i>Cephalonomia</i>	<i>C. hyalinipennis</i>	GenBank	GU213928	-	GU213961
		<i>C. stephanoderis</i>	GenBank	GU213929	GQ374632	GU213962
	<i>Discleroderma</i>	<i>Discleroderma sp.A</i>	Doc 226	-	-	Y
		<i>Discleroderma sp.B</i>	Doc 194	-	Y	Y
	<i>Glenosema</i>	<i>Glenosema elevata</i>	Doc 78	Y	Y	-
		<i>Prorops nasuta</i>	Doc 75	Y	Y	Y
	<i>Prorops</i>	<i>Prorops sp.A</i>	Doc 396	-	Y	Y
		<i>Prorops sp.B</i>	GenBank	GU213927	-	-
		<i>Plastanoxus sp.A</i>	Doc 406	-	-	Y
	<i>Plastanoxus</i>	<i>Plastanoxus sp.</i>	GenBank	-	-	GU213937
		<i>Sclerodermus sp.</i>	Doc 137	Y	Y	Y
	<i>Sclerodermus</i>	<i>S. guani</i>	GenBank	-	-	FJ603062
		<i>S. sichuanensis</i>	GenBank	-	-	FJ603063
	<i>Solepyris</i>	<i>Solepyris sp.</i>	Doc 439	-	Y	Y
	<i>Tuberepyris</i>	<i>Tuberepyris sp.</i>	Doc 434	-	-	Y

¹Em parêntesis, o número de gêneros de cada subfamília); ²CEUFES: Coleção Entomológica da UFES (Doc) ou GenBank.

CAPÍTULO 3

**Relações filogenéticas intergenéricas
das subfamílias de Bethylidae**

RESUMO

Bethylidae formam um grupo de vespas diverso, abundante e com distribuição mundial. Atualmente são reconhecidas cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae e Mesitiinae) e uma subfamília fóssil (Lancepyrinae) alocados em 102 gêneros, sendo 89 viventes. O presente trabalho utilizou sequências de um gene mitocondrial (citocromo oxidase I) e de um gene nuclear (subunidade maior do gene 28S ribossomal) de 50 gêneros de Bethylidae. As análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança e Bayesiana foram realizadas com os genes de maneira separada e com os genes concatenados. Alguns grupos foram destacados como resolvidos taxonomicamente e não apresentam dúvidas sobre sua identidade. Para outros grupos é evidenciada a necessidade de estudos moleculares e morfológicos mais detalhados para a delimitação taxonômica e elucidação das relações filogenéticas. Bethylinae foi recuperado como agrupamento monofilético e os gêneros *Lytopsenella* Kieffer, 1905 e *Eupsenella* Westwood, 1874 como grupo-irmão e basal ao agrupamento formado pelos demais gêneros. *Goniozus* Förster, 1856 mostrou ser um gênero polifilético. Pristocerinae foi recuperado como monofilética e subdividida em linhagens bem definidas, congruentes com sinapomorfias morfológicas. *Pristocera* Klug, 1808 foi recuperado como parafilético em relação *Kathepyris* Kieffer, 1907. Epyrinae e Scleroderminae tiveram um histórico taxonômico conturbado, e apresentaram a necessidade de estudos filogenéticos mais aprofundados. Em Epyrinae, o gênero *Epyris* Westwood, 1832 foi recuperado como polifilético. Em relação à Scleroderminae, o gênero *Discleroderma* Kieffer, 1904 não teve suporte para serem agrupados na subfamília, ainda, os gêneros *Glenosema* Kieffer, 1905, *Tuberepyris* Lanes & Azevedo, 2008 e *Solepyris* Azevedo, 2006 foram recuperados como linhagens dentro de Epyrinae e não como pertencentes à Scleroderminae. A subdivisão em tribos de Mesitiinae não foi recuperada, sendo considerado um arranjo artificial.

ABSTRACT

Bethylidae form a diverse group of wasps, abundant and worldwide distribution. Currently there are five recognized living subfamilies (Bethylinae, Pristocerinae, Epyrinae, Scleroderminae and Mesitiinae) and one fossil subfamily (Lancepyrinae) distributed among 102 genera of which 89 are living. In this work we used sequences of one mitochondrial genes (cytochrome oxidase subunit I) and one nuclear gene (large subunit 28S of ribosomal DNA) representing 50 Bethylinid's genus. In Bethylinae the genera *Lytopsenella* Kieffer, 1905 and *Eupsenella* Westwood, 1874 were recovered as sister and basal-group of all other genera. *Goniozus* Förster, 1856 is polyphyletic and should be represented for more than one genus. The subdivision of Pristocerinae into well defined lineages was congruent with morphological synapomorphies of the group. *Pristocera* Klug, 1808 was recovered as paraphyletic in relation to *Kathepyris* Kieffer, 1907, raising questions about the identity of these two genera. Epyrinae and Scleroderminae have had a confusing taxonomic history and the molecular phylogeny demonstrated the need for deeper phylogenetic studies. In Epyrinae, *Epyris* Westwood, 1832 was recovered as polyphyletic. In Scleroderminae, the position of *Discleroderma* Kieffer, 1904 is uncertain and the genus *Glenossema* Kieffer, 1905, *Tuberepyris* Lanes & Azevedo, 2008 and *Solepyris* Azevedo, 2006 were included in Epyrinae and not in Scleroderminae as prescribed in morphology-based studies. The subdivision of Mesitiinae into tribes was not recovered, being considered an artificial cluster.

INTRODUÇÃO

Bethylidae pertence à superfamília Chrysidoidea (Finnamore & Brothers, 1993) e atualmente é representada por 2481 espécies, organizadas em 102 gêneros, e cinco subfamílias viventes (Bethylinae, Epyrinae, Mesitiinae, Scleroderminae e Pristocerinae) e uma fóssil (Lancepyrinae) (Alencar & Azevedo, 2013; Azevedo & Azar, 2012). São ectoparasitóides principalmente de microlepidópteros (Bethylinae) e coleópteros (demais subfamílias) (Evans, 1964; Carr *et al.*, 2010; Azevedo & Azar, 2012).

De modo geral, Bethylidae é cosmopolita e sua maior diversidade ocorre nas regiões tropicais do planeta (Azevedo, 2006). Pristocerinae, Epyrinae e Scleroderminae são as mais diversificadas, com distribuição em todas as regiões zoogeográficas (ver Capítulo 2 do presente estudo) com prevalência de Pristocerinae e Epyrinae na região Oriental e Etiópica; enquanto Scleroderminae ocorre em todas as regiões zoogeográficas de maneira mais uniforme. Bethylinae, por sua vez, possui apenas sete gêneros viventes e, apesar da subfamília ocorrer em todas as regiões, alguns gêneros têm distribuição muito restrita como *Prosierola* Kieffer, 1905 *Eupsenella* e *Lytopsenella*. Mesitiinae possui uma distribuição peculiar só ocorrendo no Velho Mundo (Europa, Ásia e África).

As relações hierárquicas entre os gêneros das subfamílias foram investigadas em poucos trabalhos. Bethylinae foi a subfamília de Bethylidae mais investigada (Polaszek & Krombein, 1994; Terayama, 1995a e Ploeg & Nel, 2004), seguida de Epyrinae (Alencar & Azevedo, 2013 e Lanes & Azevedo, 2008) e Pristocerinae (Terayama, 1996), enquanto Mesitiinae nunca foi alvo de estudos cladísticos.

Embora Evans (1964) tenha sido o primeiro a fazer, em suas próprias palavras, uma tentativa preliminar para recuperar as prováveis relações entre os gêneros de Bethylidae que ocorrem nas Américas, não usou nenhum método cladístico para inferir as relações entre os gêneros (Figura 3.1).

Os estudos usando dados morfológicos que envolveram Bethylinae mostram que a relação entre os sete gêneros não está esclarecida e são discordantes (Polaszek & Krombein, 1994; Terayama, 1995a; Ploeg & Nel, 2004).

A monofilia de Pristocerinae já foi confirmada previamente (Carpenter, 1999; Carr *et al.*, 2010; Terayama, 2003a), porém as relações internas só foram investigadas com dados morfológicos por Sorg (1988) utilizando cinco gêneros e por Terayama (1996) utilizando 17 gêneros.

Estudos envolvendo a subfamília Epyrinae foram os mais complexos, pois Scleroderminae esteve incluída em Epyrinae até meados do século passado quando a subfamília foi dividida nas tribos Epyrini, Cephalomiini e Sclerodermini (Evans, 1964). Mais tarde, Lanes

e Azevedo (2008) sinonimizaram Cephalonomiini e Sclerodermini. Recentemente, Alencar & Azevedo (2013) elevaram Sclerodermini sensu Lanes e Azevedo (2008) e Epyrini ao *status* de subfamília e realizaram um estudo envolvendo os 12 gêneros de Epyrinae.

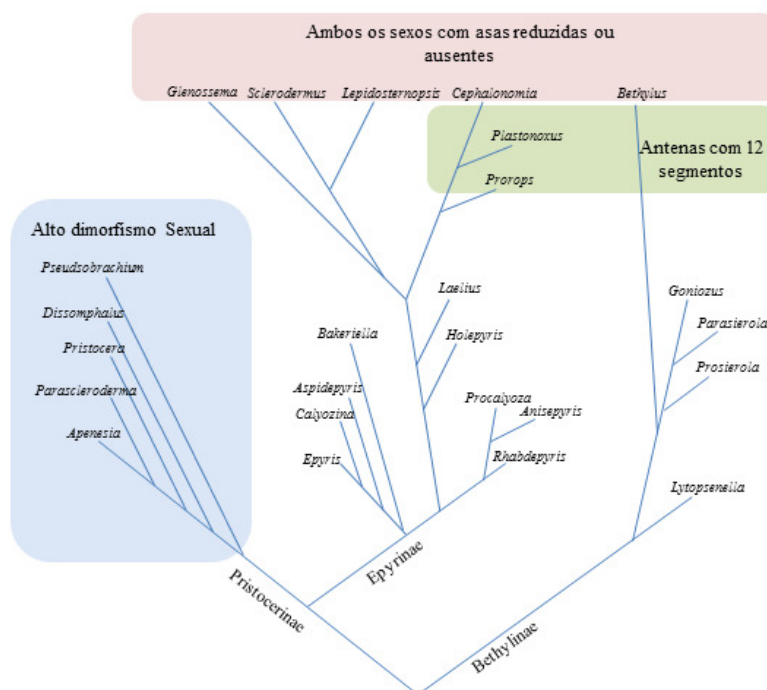


Figura 3.1. Proposta das relações interna de Bethyloidea modificado de Evans (1964).

Nenhum estudo das relações filogenéticas foi realizado entre os gêneros de Mesitiinae. Os dados filogenéticos que incluem Mesitiinae inferem apenas a relação da subfamília com as demais. Argaman (2003) dividiu a subfamília em quatro tribos: Mesitiini, Heterocoelini, Domonkosini e Triglenusini, porém suas decisões não se basearam em testes cladísticos e esse grupo não foi mais investigado.

O único estudo disponível com dados moleculares foi desenvolvido por Carr *et al.* (2010), envolveu 18 gêneros de Bethyloidea e continha poucos representantes de cada subfamília, sendo Epyrinae representado apenas por quatro dos 17 gêneros e Pristocerinae por cinco dos 22 gêneros. Assim, estudos mais abrangentes de cada subfamília podem trazer novas interpretações quanto à relação dos gêneros dentro de cada subfamília.

Nosso presente estudo pretende avaliar as relações entre os gêneros de Bethyloidea utilizando dois marcadores genéticos, um mitocondrial e um nuclear, envolvendo uma amostra representativa de cada subfamília, além de propor o período de origem e diversificação dos gêneros e estimar a área provável em que a diversificação ocorreu.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

O grupo interno foi composto de 97 sequências obtidas no presente trabalho e de 28 sequências retiradas do GenBank, sendo 16 sequências comuns a gêneros utilizadas no presente estudo e duas sequências de gêneros exclusivos do GenBank (*Rhabdepyris* Kieffer, 1904 e *Cephalonomia*). No total, utilizou-se 125 sequências pertencentes a 50 dos 89 gêneros viventes de Bethyridae (Tabela 2.2). Sequências do GenBank de exemplares de Aculeata foram utilizadas como grupo externo. Sequências retiradas do GenBank de exemplares de Aculeata foram utilizados para compor o grupo externo. Para a matriz do Gene COI foram utilizadas sequências do GenBank de *Tatuidris tatusia* da família Formicidae (JX82795) e *Apis nigrocincta* da família Apidae (DQ020232). Na matriz do gene 28S rDNA, foram utilizadas as sequências de cinco membros de Aculeata: *Apis nigrocincta* (AF181591); *Dolichovespula arenaria* (GU596723); *Bupon sp* (GU213974); *Cleptes semiauratus* (GU213975) e *Chrysis ruddii* (GU213973). Na análise referente ao gene 16S rDNA foi utilizado para compor o grupo externo sequências de *Chrysis analis* (AJ514344), *Trichrysis cyanea* (AJ514362) e *Apis nigrocincta* (AF181581). Na análise concatenada foram utilizadas as sequências dos três genes do exemplar de *Apis nigrocincta* como grupo externo.

A classificação para subfamílias e para gêneros de Scleroderminae foi baseada em Alencar & Azevedo (2013) e Lanes & Azevedo (2008). O gênero *Foenobethylus* Kieffer, 1913 foi classificado segundo Várkonyi & Polaszek (2007). Um novo gênero foi identificado por Gobbi (2013). Os demais gêneros seguiram a classificação utilizada por Terayama (2003b).

Os exemplares de Bethyridae utilizados no presente estudo estão tombados na Coleção Entomológica da Universidade Federal do Espírito Santo em via úmida e em via seca.

Métodos

Extração, amplificação por PCR e sequenciamento do DNA

A extração de DNA total foi realizada a partir do abdome e da genitália, utilizando o kit de extração de DNA NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), diluindo a amostra em média a 40ul. O extrato de DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific).

Foram amplificados o genes mitocôndrial Citocromo oxidase I (COI) e o gene nuclear 28S rDNA, utilizando os *primers* descritos Tabela 3.2.

Foi realizada a amplificação dos fragmentos utilizando a reação em cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador ABI Veriti® para um volume final de 25 µl. As reações de PCR continham 1x de solução tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada *primer* e 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 94°C por 60 segundos; (2) 40 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 44-55°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação parcial do gene mitocondrial COI (~ 670 pb) foi realizada utilizando-se como padrão os *primers* HCO 2198 e LCO 1490. Entretanto, quando o DNA se encontrava muito degradado e/ou apresentava amplificação cruzada com contaminadores, foi utilizado *primers* internos menores e mais específicos AP-L-2176F e HCO 2198 (335 pb) e LCO 2198 e AP-L-2176R (335 pb).

Para amplificar a região D2/D3 da subunidade maior do gene nuclear (28S rDNA, 680 pb) foram utilizados os *primers* F2 e D3. Para casos de amplificação cruzada de DNA de fungos ou outros contaminantes presentes nas amostras, foi utilizados os *primers* F2 e D3Rev2, gerando um fragmento de aproximadamente 570 pb. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e o tamanho e a qualidade das bandas foram estimadas com auxílio de marcadores moleculares de 1 Kb. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT®, e as sequências foram geradas no Núcleo de Genética Aplicado à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES e na MACROGEN Inc. (Seoul, Korea) (<http://dna.macrogen.com>).

A identidade das sequências foram confirmadas através do método BLAST (Altschul 1997) que compara as sequências geradas com as disponíveis no GenBank.

Tabela 3.1. Espécimes de Bethylidae utilizados no presente estudo, com destaque nos genes analisados por indivíduos: citocromo oxidase I (COI) e 28S (28S rRNA).

Família: Subfamília ¹	Gênero	COI	28S rRNA
Bethylidae: Bethylinae (7)	<i>Bethylus</i>	✓	✓
	<i>Eupsenella</i>	✓	✓
	<i>Goniozus</i>	✓	✓
	<i>Lytopsnella</i>	✓	✓
	<i>Odontepyris</i>	✓	✓
	<i>Prosierola</i>	✓	✓
	<i>Sierola</i>	✓	✓
Bethylidae: Epyrinae (17)	<i>Anisepyris</i>	✓	✓
	<i>Bakeriella</i>	✓	✓
	<i>Disepyris</i>	✓	✓
	<i>Epyris</i>	✓	✓
	<i>Formosiepyris</i>	✓	✓
	<i>Holepyris</i>	✓	✓
	<i>Trachepyris</i>	✓	✓
	<i>Rhabdepyris</i>	✓	
	<i>Laelius</i>		✓
Bethylidae: Mesitiinae (22)	<i>Codorcas</i>		✓
	<i>Clytovorus</i>		✓
	<i>Heterocoelia</i>	✓	✓
	<i>Mettrionotus</i>	✓	✓
	<i>Mesitius</i>	✓	✓
	<i>Pilomesitius</i>	✓	✓
	<i>Pseudomesitius</i>	✓	✓
	<i>Sulcomesitius</i>	✓	✓
	<i>Ukayakos</i>		✓
	<i>Zimankos</i>	✓	✓
	<i>Itapayos</i>		✓
Bethylidae: Pristocerinae (22)	<i>Acrepyris</i>	✓	✓
	<i>Apenesia</i>	✓	
	<i>Dissomphalus</i>	✓	✓
	<i>Foenobethylus</i>	✓	✓
	<i>Kathepyris</i>		✓
	<i>Neoapenesia</i>	✓	✓
	<i>Parascleroderma</i>	✓	✓
	<i>Pristocera</i>	✓	✓
	<i>Caloapenesia</i>	✓	
	<i>Gênero nov</i>	✓	
	<i>Protisobrachium</i>	✓	✓
	<i>Trichiscus</i>	✓	✓
	<i>Pseudobrachium</i>	✓	✓
	<i>Allobethylus</i>		✓
Bethylidae: Scleroderminae (21)	<i>Cephalonomia</i>	✓	✓
	<i>Discleroderma</i>	✓	✓
	<i>Glenosema</i>	✓	
	<i>Prorops</i>	✓	✓
	<i>Plastanoxus</i>		✓
	<i>Sclerodermus</i>	✓	✓
	<i>Solepyris</i>	✓	✓
	<i>Tuberepyris</i>		✓

¹Em parênteses o número de gêneros reconhecidos vivos por subfamília

Tabela 3.2. Sequências de *primers* utilizados.

Gene	Código	Temperatura de anelamento	Sequência (5'→3')	Referência
28S rDNA	Forward (F2)	55 °C	CGT GTT GCT TGA TAG TGC AGC	Belshaw & Quicke (1997)
	Reverse (D3)	55 °C	TAG TTC ACC ATC TTT CGG GTC	Mardulyn & Whitfield (1999)
	Reverse interno (D3Rev2)	55 °C	GACCCATCCTCCCTCGGTC	Presente estudo
COI	Reverse (HCO2198)	44-47 °C	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTT GG	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	Forward (LCO2198)	44-47 °C	TAA ACTT CAG GGT GAC CAA AAA ATCA	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	Forward (APL-2176F)	44-47 °C	GGT ACA GGT TGA ACTG TTT ACC C	Pedersen (1996)
	Reverse (APL-2176R)	44-47 °C	GGG TAA ACA GTT CAA CCT GTA CC	Presente estudo

Análises filogenéticas

Alinhamento das sequências

O gene citocromo oxidase foi alinhado de acordo com a sequência de aminoácidos da respectiva proteína no programa MEGA ver. 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) através do *software* CLUSTALX ver. 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). O gene ribossomal foi alinhado separadamente utilizando o portal MAFFT (v.6; <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online>), por meio da estratégia Q-INS-I, levando em consideração a estrutura secundária do RNA para um conjunto de dados pequenos (<200 taxa) de acordo com (Kato *et al.*, 2009).

As divergências genéticas dentro das subfamílias foram estimadas no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), segundo o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). As mutações do tipo inserções-deleções (*indels*) foram consideradas como sendo deleções completas e por isso não entraram no cálculo. O cálculo de tendência da composição nucleotídica (*bias*) também foi realizado no programa MEGA5. O grau de saturação das sequências foi verificado no programa DAMBE 5.0.23 (Xia & Xie, 2001) através do teste de Xia (Xia *et al.*, 2003).

Foram realizadas análises filogenéticas para cada gene em separado e para os dois genes concatenados. As relações filogenéticas foram estimadas através de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV) para os genes individualmente e para a análise dos genes concatenados as relações foram estimadas somente pela MV. Os modelos de substituição nucleotídicas utilizados nas análises foram selecionados para cada marcador individualmente aplicando o critério de informação Bayesiana implementado no programa MODELTEST ver. 0.1 (Posada, 2008).

Para as análises de IB, foi utilizado o programa MRBAYES ver. 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Na análise com os genes concatenados, cada partição utilizou modelos

evolutivos independentes. As buscas consistiram em duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas (uma *cold chain* e três *heated chains*). As cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) foram conduzidas com trinta 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. O suporte dos ramos foi obtido através das probabilidades posteriores e a confiabilidade dos clados foi aceita quando a probabilidade posterior foi superior a 95.

A análise de MV foi realizada no portal CIPRES (www.phylo.org/sub_sections/portal) utilizando a ferramenta RAxML Bootstrapping (Stamatakis *et al.*, 2008). Na análise dos genes concatenados, cada partição foi modelada de forma independente e foram realizadas 1000 replicações de *Bootstrap* (BT) para evidenciar o grau de confiabilidade dos clados, sendo aceitos como confiáveis valores acima de 60.

A visualização e a editoração das árvores filogenéticas foram realizadas no programa FigTree v1.0.4.

RESULTADOS

Para a obtenção das sequências de 97 indivíduos foram extraídos os DNAs de 471 exemplares, representando sucesso de 20%. Somando-se às 28 sequências do GenBank, a amostra total representa 50 gêneros de Bethylidae (56% dos gêneros viventes), 100% dos gêneros viventes de Bethylinae, 52% de Epyrinae, 42% de Scleroderminae, 50% de Mesitiinae e 59% de Pristocerinae.

Várias sequências geradas, quando testadas com a ferramenta BLAST, apresentaram mais de 85% de similaridade com Coleópteros, Lepidópteros, insetos praga de coleção (*Liposcelis bostrychophila*), fungos e até mesmo contaminação com humanos. Nesses casos houve a tentativa de amplificar o DNA do exemplar utilizando um *primer* mais específico (Tabela 3.2), de modo a evitar a amplificação cruzada.

Após o alinhamento das sequências do gene COI, a retirada das extremidades e a correção de inserções-deleções (*indels*), foi gerada uma matriz de dados com 646 pb com 62 táxons terminais, sendo dois referentes ao grupo externo. Não foi verificada a saturação em nenhuma das posições de códon (índice de saturação de sequências menor que o valor crítico (ISS<ISS.C)).

O alinhamento das sequências do gene 28S rDNA revelou um número grande de *indels*, intercalados por blocos grandes de homologies, um padrão típico de alinhamento de sequências ribossomais. A matriz do gene 28S rDNA, após alinhamento, foi composta por 764 pb e 98 táxons terminais, sendo oito referentes ao grupo externo.

O modelo evolutivo que melhor se adequou às análises para os genes COI foi o GTR+I+G, enquanto que para o gene 28S rDNA foi o GTR+G. Na análise concatenada foram aplicados modelos separados para cada partição. As filogenias de MV e IB obtidas para cada gene e para a análise concatenada mostraram topologias concordantes.

A análise concatenada recuperou Bethylidae como monofilética (BT=99), assim como Bethylinae, Epyrinae e Mesitiinae (BT>99). Pristocerinae apresentou valor de suporte (BT=54) causado pelo fraco agrupamento dos gêneros *Caloapenesia* e *Pseudisobrachium* Kieffer, 1904 na subfamília. Espécies de Scleroderminae agruparam com Mesitiinae (BT=98), porém o suporte para a monofilia de Scleroderminae foi baixo (BT<60) (Figuras 3.2.a, 3.3.a, 3.4.a, 3.5.a).

A análise independente dos genes COI e 28S rDNA recuperou Bethylidae como monofilética (BT>98; PP>1.00), assim como Bethylinae (Figura 3.2.b-c, BT>98; PP>0.99), Pristocerinae (Figura 3.3.b-c, BT>82; PP>0.99) e Mesitiinae (Figura 3.5.b-c, BT>84; PP=1.00). Epyrinae foi recuperada como monofilética na análise de 28S rDNA (Figura 3.4.c, BT=100, PP=1.00), entretanto na análise do gene COI o suporte da subfamília foi baixo (Figura 3.4.b, BT=50; PP=0.94). Espécies de Scleroderminae agrupam com Mesitiinae (Figura 3.5.b-c, BT>81, PP>0.98), porém Scleroderminae não foi recuperada como monofilética em nenhuma das análises.

BETHYLINAE

Dos sete gêneros de Bethylinae, a análise dos genes COI e 28S rDNA foi possível para *Goniozus* (Evans, 1978), *Odontepyris* Kieffer, 1904, *Sierola* Cameron, 1881 e *Prosierola* enquanto que para *Lytopsenella* e *Eupsenella* só utilizou-se o gene COI (a sequência de *Lytopsenella* continha somente 350pb) e para *Bethylus* Latreille, 1802 somente o gene 28S rDNA. Para testar a validade da sinonímia de *Parasierola* Cameron, 1883 e *Goniozus*, os indivíduos formalmente descritos como *Parasierola* foram identificados como *Goniozus* (var. *Parasierola*).

Na análise de MV dos genes concatenados (Figura 3.2a), *Eupsenella* e *Lytopsenella* (clado A) aparecem como grupo-irmão (BT=64) e se agrupam com o clado formado pelos demais gêneros (clado B) com BT=60. O clado B, é subdividido em *Bethylus* (BT=100), *Sierola* (BT=100) e os demais gêneros *Goniozus*, *Prosierola* e *Odontepyris* (Clado C) com alto suporte (BT=99). A relação entre *Bethylus* e *Sierola* não é bem resolvida. *Goniozus* mostrou-se polifilético. Representantes de *Goniozus sensu stricto* e *Goniozus* (var. *Parasierola*) estão representados tanto no clado D quanto no clado G. *Prosierola* (BT=100) é grupo-irmão de *Goniozus* (Clado F). *Odontepyris* é grupo-irmão de *Prosierola* e *Goniozus* (clado E) com alto suporte (BT=94).

Na análise do gene COI (Figura 3.2.b) *Eupsenella* e *Lytopsenella* (BT=88; PP<0.95) são recuperados como grupo-irmão dos demais gêneros. *Sierola* foi recuperado como monofilético (BT=99; PP=0.99) e grupo-irmão do clado contendo *Odontepyris*, *Prosierola* e *Goniozus* (BT=100; PP=1.00). A relação entre *Odontepyris*, *Prosierola* e *Goniozus* não foi esclarecida com esse gene.

Na análise com o gene 28S rDNA (Figura 3.2.c), onde foi incluído um número maior de representantes *Goniozus*, foi observado que além de *Goniozus* (*sensu strictu*) e *Goniozus* (var. *Parasierola*) serem parafilético, a relação entre *Prosierola*, *Goniozus* (*sensu strictu*) e *Goniozus* (var. *Parasierola*) não foi esclarecida.

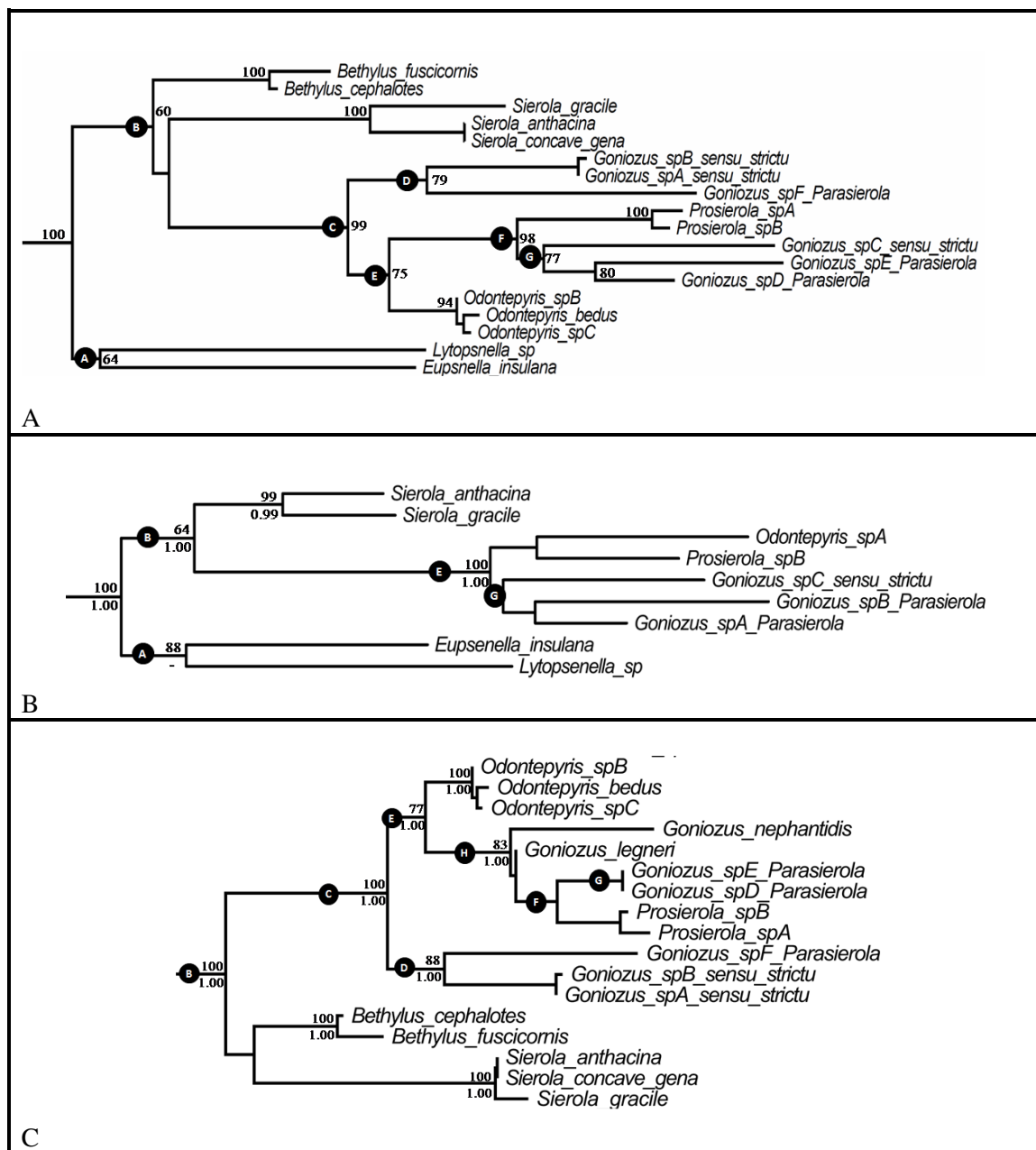


Figura 3.2. Filogenia de Bethylinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*.

Divergência genética dentro de Bethylinae

A análise de divergência do gene COI em Bethylinae (Tabela 3.3) apresentou uma variação intergenérica de 17-34%. *Lytopsenella* e *Eupsenella* apresentaram divergência entre si de 23% e de 17-34% entre os demais gêneros. *Eupsenella* mostrou menor divergência em relação a *Sierola* (17%) do que entre *Lytopsenella* (23%). A menor variação intragenérica foi em *Sierola*, com 13% e a maior foi observada em *Goniozus* com 17-22%.

Na análise do gene 28S rDNA (Tabela 3.4), a divergência intragenérica foi baixa para *Sierola* (0-1%), *Bethylus* (0%), *Prosierola* (1%), *Odontepyris* (0%). A divergência intragenérica de *Goniozus* (var. *Parasierola*) é de 0% entre representantes do clado G, e 9% com o representante do clado D. A divergência intragenérica em *Goniozus* (*strictu sensu*) também mostrou padrão similar, com 0% entre representantes do clado D e 11% entre *Goniozus* (clado D) e *Goniozus nephantidis*. *Bethylus* divergiu de 9-14% em relação aos demais gêneros.

Tabela 3.3. Estimativa de divergência par-a-par entre sequências de COI (296 pb) entre os gêneros de Bethylinae.

1 <i>Lytopsenella</i> _sp	1	2	3	4	5	6	7	8
2 <i>Eupsenella</i> _insulana	0,23							
3 <i>Sierola</i> _gracile	0,21	0,17						
4 <i>Sierola</i> _anthacina	0,27	0,19	0,13					
5 <i>Prosierola</i> _spB	0,24	0,27	0,24	0,27				
6 <i>Odontepyris</i> _spA	0,28	0,27	0,24	0,28	0,16			
7 <i>Goniozus</i> _spD_var. <i>Parasierola</i>	0,27	0,27	0,27	0,24	0,17	0,18		
8 <i>Goniozus</i> _spC_strictu_sensu	0,23	0,29	0,25	0,25	0,21	0,18	0,17	
9 <i>Goniozus</i> _spE_var. <i>Parasierola</i>	0,34	0,33	0,32	0,29	0,21	0,18	0,18	0,22

Tabela 3.4. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de 28S entre os gêneros de Bethylinae.

1 <i>Sierola</i> _gracile	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2 <i>Sierola</i> _concave_gena	0,01															
3 <i>Sierola</i> _anthacina	0,01	0,00														
4 <i>Odontepyris</i> _spB	0,14	0,13	0,13													
5 <i>Odontepyris</i> _spC	0,14	0,13	0,13	0,00												
6 <i>Odontepyris</i> _bedus	0,14	0,13	0,13	0,00	0,00											
7 <i>Goniozus</i> _nephantidis	0,18	0,18	0,18	0,07	0,08	0,08										
8 <i>Goniozus</i> _legneri	0,13	0,13	0,13	0,02	0,03	0,03	0,06									
9 <i>Goniozus</i> _spA_sensu_strictu	0,15	0,14	0,14	0,07	0,07	0,07	0,11	0,07								
10 <i>Goniozus</i> _spB_sensu_strictu	0,15	0,15	0,15	0,07	0,08	0,08	0,12	0,07	0,00							
11 <i>Goniozus</i> _spD_var. <i>Parasierola</i>	0,14	0,13	0,13	0,03	0,03	0,03	0,05	0,00	0,07	0,07						
12 <i>Goniozus</i> _spE_var. <i>Parasierola</i>	0,14	0,13	0,13	0,03	0,03	0,03	0,05	0,00	0,07	0,07	0,00					
13 <i>Goniozus</i> _spF_var. <i>Parasierola</i>	0,15	0,14	0,14	0,08	0,08	0,08	0,13	0,08	0,07	0,08	0,09	0,09				
14 <i>Bethylus</i> _fuscicornis	0,09	0,08	0,08	0,09	0,10	0,10	0,13	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,11			
15 <i>Bethylus</i> _cephalotes	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,13	0,09	0,10	0,11	0,09	0,09	0,11	0,00		
16 <i>Prosierola</i> _spA	0,14	0,13	0,13	0,03	0,03	0,03	0,07	0,02	0,07	0,07	0,02	0,02	0,09	0,09	0,10	
17 <i>Prosierola</i> _spB	0,14	0,12	0,12	0,03	0,03	0,03	0,07	0,01	0,07	0,07	0,02	0,02	0,08	0,09	0,09	0,01

PRISTOCERINAE

Observa-se a formação de dois clados com alto suporte na análise dos genes concatenados de Pristocerinae (Figura 3.3.a). O clado A (BT=71) é formado por *Caloapenesia* Terayama, 1995 + *Gênero nov.* (clado I) e *Pseudisobrachium* (clado C). O agrupamento desses três gêneros em Pristocerinae apresentou baixo valor de suporte (BT=54).

O clado B (BT=99) é formado pelos demais gêneros, subdividido em dois ramos principais (clados D e E). O clado D (BT=69) é formado por *Foenobethylus*+*Parascleroderma* Kieffer, 1904 (BT=98), grupo-irmão de *Apenesia* Westwood, 1874 (BT=81). O clado E é dividido em clado G formado por *Pristocera*, *Acrepyris* Kieffer, 1905 e *Kathepyris* (BT=97) e clado F formado por *Dissomphalus* Ashmead, 1883 + *Trichiscus* Benoit, 1956 (BT=97).

Na análise com o gene COI (Figura 3.3.b), *Pseudisobrachium* não é recuperado como grupo-irmão de *Caloapenesia* e *Gênero nov.* (clado I), não recuperando, assim, o clado A. *Pseudisobrachium* (clado C) é um grupo basal e irmão do clado B. Na análise desse gene foi adicionado um exemplar do gênero *Neoapenesia* Terayama, 1995 que agrupou com os demais gêneros de *Apenesia* (clado D), recuperando *Apenesia* como parafilético (BT=100; PP<=1.00). Também foram adicionados exemplares do gênero *Protisobrachium*, recuperado como grupo-irmão de *Dissomphalus* (clado H). *Trichiscus* (clado E) é recuperado como grupo-irmão de *Dissomphalus* e *Protisobrachium* (BT=74; PP=1.00). O clado G é recuperado com *Acrepyris* e *Pristocera* (BT=98, PP=1.00).

Na análise com o gene 28S rDNA (Figura 3.3c) *Pristocera* é recuperado como grupo parafilético em relação à *Acrepyris* e *Kathepyris* (Figura 3.3c). *Protisobrachium* Benoit, 1957 enraíza o agrupamento *Dissomphalus* + *Trichiscus*.

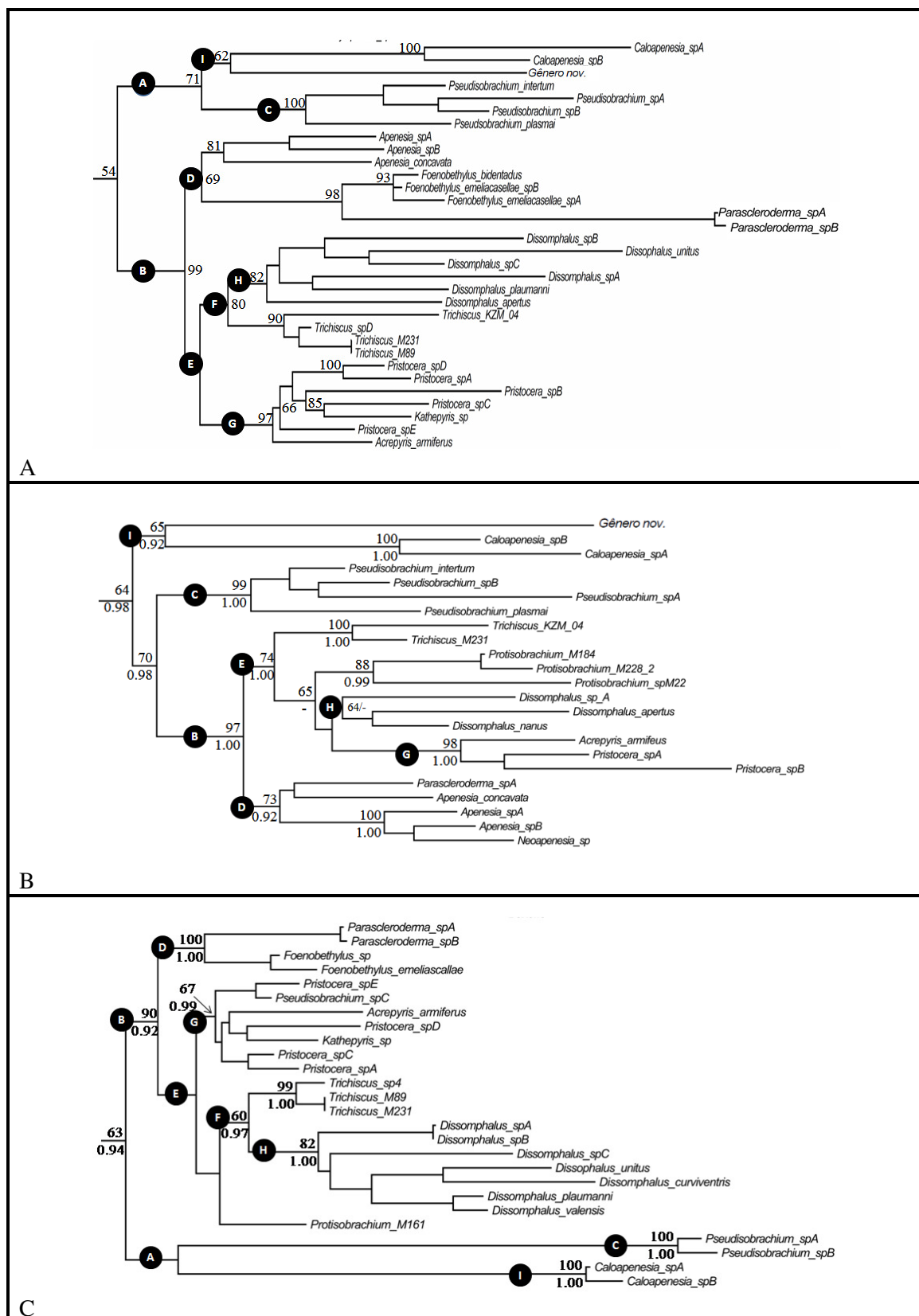


Figura 3.3. Filogenia de Pristocerinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a posteriori*.

Divergência genética dentro de Pristocerinae

A divergência genética do gene COI intragenérica dentro da subfamília foi de 18% dentro de *Trichiscus*, 30% em *Pristocera* e 28% em *Caloapenesia*. Entre as espécies de *Apenesia* a distância genética variou de 15-26%, de 17-28% entre representantes de *Dissomphalus*, de 3-23% em *Protisobrachium* e 13-28% em *Pseudisobrachium*.

A divergência entre *Neoapenesia* e *Apenesia* foi de 12-26%, divergência menor do que a divergência interna de *Apenesia*. A divergência entre as espécies de *Pristocera* e *Acrepyris* variou entre 26-28%, menor do que a variação dentro de *Pristocera*.

Os gêneros *Caloapenesia* e *Gênero nov.* apresentaram uma taxa de alta divergência em relação aos demais gêneros variando de 46 a 53%.

A análise de distância do gene 28s dentro de Pristocerinae apresenta valores de divergência menores do que o gene COI (0.0-27%)

A divergência intragenérica foi de 0% em *Parascleroderma*, 1% em *Pseudisobrachium*, 2% dentro de *Trichiscus* e *Caloapenesia* e 4% dentro de *Foenobethylus*. Dentro de *Pristocera* variou de 2 a 11% e dentro de *Dissomphalus* de 7-12%

Os gêneros que mais divergem em relação aos demais são *Caloapenesia* e *Pseudisobrachium* (19-30%).

Novamente, a divergência entre espécies de *Pristocera* foi maior entre representantes do gênero do que entre *Acrepyris*. A divergência entre *Pristocera* spA e *Acrepyris* armiferus foi de 0.4% enquanto que entre *Pristocera* spA e *Pristocera* spC foi de 11%.

O exemplar *Pseudisobrachium* spC, sequenciado pelo trabalho de Carr *et al.* (2010) diverge 17% dos demais *Pseudisobrachium* de nossa amostra em 2%-10% de *Pristocera*, indicando o possível erro de identificação desse exemplar.

Tabela 3.5. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (251 pb) entre os gêneros de *Pristocerinae*.

1 <i>Apenesia_concavata</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2 <i>Apenesia_spA</i>	0,26																				
3 <i>Apenesia_spB</i>	0,27	0,15																			
4 <i>Neoapenesia_sp</i>	0,26	0,13	0,12																		
5 <i>Acrepyris_armifeus</i>	0,29	0,30	0,30	0,31																	
6 <i>Pristocera_spB</i>	0,35	0,35	0,35	0,31	0,28																
7 <i>Pristocera_spA</i>	0,38	0,36	0,36	0,35	0,26	0,30															
8 <i>Trichiscus_KZM_04</i>	0,28	0,28	0,32	0,34	0,34	0,37	0,34														
9 <i>Trichiscus_M231</i>	0,27	0,22	0,23	0,23	0,29	0,36	0,28	0,18													
10 <i>Dissomphalus_sp_A</i>	0,35	0,36	0,32	0,34	0,35	0,37	0,32	0,35	0,33												
11 <i>Dissomphalus_apertus</i>	0,35	0,26	0,23	0,28	0,34	0,35	0,29	0,29	0,23	0,28											
12 <i>Dissomphalus_nanus</i>	0,23	0,27	0,24	0,27	0,25	0,31	0,30	0,27	0,22	0,24	0,17										
13 <i>Protisobrachium_M228_2</i>	0,28	0,25	0,24	0,24	0,29	0,35	0,34	0,27	0,21	0,29	0,25	0,19									
14 <i>Protisobrachium_M184</i>	0,29	0,27	0,23	0,23	0,29	0,35	0,34	0,28	0,23	0,32	0,24	0,19	0,03								
15 <i>Protisobrachium_spM22</i>	0,36	0,31	0,33	0,33	0,34	0,35	0,32	0,29	0,24	0,33	0,28	0,27	0,23	0,23							
16 <i>Pseudisobrachium_spB</i>	0,34	0,35	0,30	0,32	0,34	0,37	0,37	0,38	0,35	0,37	0,31	0,28	0,30	0,30	0,32						
17 <i>Pseudisobrachium_intertum</i>	0,37	0,36	0,34	0,33	0,38	0,38	0,41	0,41	0,37	0,37	0,36	0,30	0,33	0,34	0,34	0,13					
18 <i>Pseudisobrachium_spA</i>	0,41	0,39	0,34	0,38	0,41	0,41	0,40	0,42	0,37	0,37	0,34	0,35	0,38	0,39	0,34	0,23	0,20				
19 <i>Pseudisobrachium_plasmai</i>	0,37	0,36	0,31	0,31	0,39	0,35	0,40	0,39	0,29	0,36	0,35	0,28	0,30	0,30	0,33	0,23	0,24	0,28			
20 Gênero nov. _sp	0,44	0,51	0,48	0,44	0,52	0,44	0,58	0,50	0,47	0,47	0,50	0,42	0,46	0,44	0,46	0,43	0,44	0,44	0,37		
21 <i>Caloapenesia_spB</i>	0,52	0,50	0,48	0,56	0,59	0,55	0,49	0,47	0,49	0,56	0,45	0,46	0,49	0,48	0,42	0,50	0,50	0,49	0,45	0,47	
22 <i>Caloapenesia_spA</i>	0,53	0,50	0,52	0,53	0,54	0,55	0,54	0,46	0,49	0,49	0,50	0,52	0,44	0,47	0,51	0,50	0,48	0,47	0,48	0,51	0,28

Tabela 3.6. Estimativa de divergência par- a- entre as sequências de 28S (400pb) para *Pristocerinae*

1 <i>Pristocera_spA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
2 <i>Pristocera_spD</i>	0,10																								
3 <i>Pristocera_spC</i>	0,02	0,11																							
4 <i>Kathepyris_sp</i>	0,05	0,06	0,06																						
5 <i>Acrepyris_armiferus</i>	0,04	0,09	0,05	0,05																					
6 <i>Pristocera_spE</i>	0,06	0,11	0,07	0,05	0,05																				
7 <i>Foenobethylus_sp</i>	0,07	0,12	0,06	0,08	0,07	0,08																			
8 <i>Foenobethylus_emeliascallae</i>	0,08	0,14	0,08	0,10	0,09	0,10	0,04																		
9 <i>Parascleroderma_spB</i>	0,08	0,15	0,09	0,10	0,08	0,09	0,08	0,10																	
10 <i>Parascleroderma_spA</i>	0,08	0,14	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,09	0,00																
11 <i>Trichiscus_spD</i>	0,05	0,10	0,06	0,06	0,04	0,06	0,08	0,09	0,09	0,09															
12 <i>Trichiscus_spC</i>	0,07	0,11	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,10	0,10	0,09	0,02														
13 <i>Trichiscus_spA</i>	0,07	0,11	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,10	0,10	0,09	0,02	0,00													
14 <i>Dissomphalus_valensis</i>	0,09	0,14	0,09	0,10	0,08	0,09	0,09	0,11	0,12	0,11	0,06	0,07	0,07												
15 <i>Dissomphalus_curviventris</i>	0,10	0,16	0,10	0,12	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12	0,07	0,09	0,09	0,09											
16 <i>Dissomphalus_spC</i>	0,09	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,10	0,07	0,08	0,08	0,10	0,09										
17 <i>Dissomphalus_spA</i>	0,12	0,15	0,11	0,12	0,11	0,12	0,10	0,12	0,12	0,12	0,08	0,09	0,09	0,10	0,12	0,09									
18 <i>Dissomphalus_plaumanni</i>	0,08	0,14	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,10	0,06	0,06	0,06	0,03	0,09	0,10	0,10								
19 <i>Dissomphalus_spB</i>	0,09	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,10	0,07	0,08	0,08	0,10	0,09	0,00	0,09	0,10							
20 <i>Dissomphalus_unitus</i>	0,11	0,15	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,13	0,11	0,11	0,09	0,10	0,10	0,11	0,07	0,11	0,12	0,10	0,11						
21 <i>Protisobrachium_M161</i>	0,06	0,10	0,06	0,07	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09	0,04	0,05	0,05	0,07	0,09	0,07	0,11	0,08	0,07	0,11					
22 <i>Pseudisobrachium_A</i>	0,18	0,22	0,17	0,20	0,18	0,19	0,19	0,20	0,21	0,21	0,16	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,21	0,17				
23 <i>Pseudisobrachium_spB</i>	0,18	0,22	0,17	0,20	0,18	0,19	0,19	0,20	0,21	0,21	0,16	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,18	0,17	0,22	0,17	0,01			
24 <i>Pseudisobrachium_spC</i>	0,05	0,10	0,05	0,04	0,04	0,02	0,06	0,08	0,09	0,08	0,05	0,06	0,06	0,08	0,11	0,07	0,11	0,08	0,07	0,09	0,05	0,17	0,17		
25 <i>Caloapenesia_spC</i>	0,20	0,29	0,21	0,25	0,21	0,24	0,21	0,24	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,21	0,21	0,21	0,24	0,20	0,21	0,21	0,24	0,26	0,26	0,23	
26 <i>Caloapenesia_spD</i>	0,20	0,27	0,21	0,23	0,20	0,24	0,20	0,24	0,22	0,22	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,20	0,24	0,21	0,20	0,21	0,23	0,27	0,27	0,23	0,02

EPYRINAE

A análise dos genes concatenados de Epyrinae gerou uma filogenia com três cladogramas principais (Figura 3.4a). O clado A formado pelo gênero *Bakeriella* Kieffer, 1910 (BT=100); o clado B subdividido em clado D formado por *Formosiepyris* Terayama, 2004, *Disepyris* Kieffer, 1905 e *Holepyris* Kieffer, 1905 (BT=100) e clado E por *Epyris* e *Trachepyris* Kieffer, 1905 (BT=83) e o clado C formado por *Anisepyris* Kieffer, 1905 e *Laelius* Kieffer, 1905 (BT=95).

Na análise do gene COI (Figura 3.4b) Epyrinae não foi recuperada como monofilética e o clado A (BT=100; PP=1.00) foi recuperado como grupo-irmão do clado E (BT=73; PP<0.95).

Na análise do gene 28S rDNA (Figura 3.4c) o clado C (BT=83; PP=0.96) é grupo-irmão do clado A+B, que inclui os demais gêneros (BT=81; PP=1.00), sendo o clado A irmão do clado B. Não existe suporte para a manutenção do clado E, que é recuperado como polifilético, ressaltando que nessa análise foi incluído um exemplar de *Epyris* (*Epyris* spA), que foi recuperado como grupo-irmão de *Bakeriella*.

Disepyris é recuperado como parafilético incluído um exemplar de *Formosiepyris* em todas as análises

Divergência genética entre gêneros de Epyrinae

A divergência genética intragenérica calculada para o gene COI (Tabela 3.7) foi de 16% em *Trachepyris*, 17% *Disepyris*. A distância dentro de *Holepyris* variou de 15-19% e de 0-19% em *Bakeriella*.

A divergência intergenérica no clado D entre *Formosiepyris* e *Disepyris* foi de 2-15%, sendo menor do que a divergência interna de *Disepyris* que foi 17%. O gênero *Bakeriella* apresentou a maior divergência entre os demais gêneros variando de 15-27%.

A divergência intergenérica de Epyrinae calculada para o gene 28S rDNA (Tabela 3.8) variou de 1-26%. A divergência intragenérica foi de 9% em *Epyris*, 5% em *Trachepyris*, 1-12% em *Disepyris*, 1-3% em *Holepyris*, 5-9% em *Laelius* e de 3-12% em *Anisepyris*.

A distância de *Formosiepyris* e espécies de *Disepyris* variaram de 4-8% sendo menor que a divergência intragenérica de *Disepyris*, concordando com os dados do gene COI. O gênero *Bakeriella* apresentou a maior divergência genética em relação aos demais gêneros (18-26%).

Tabela 3.7. Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (445pb) entre os gêneros de Epyrinae.

1 <i>Trachepyrus spA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2 <i>Trachepyrus spB</i>	0,16											
3 <i>Epyris spB</i>	0,24	0,18										
4 <i>Holepyris spB</i>	0,17	0,18	0,25									
5 <i>Holepyris spC</i>	0,24	0,21	0,30	0,19								
6 <i>Holepyris spA</i>	0,20	0,20	0,23	0,16	0,15							
7 <i>Disepyrus spA</i>	0,23	0,20	0,20	0,21	0,24	0,18						
8 <i>Disepyrus spC</i>	0,23	0,24	0,28	0,25	0,24	0,19	0,17					
9 <i>Formosiepyris sp</i>	0,21	0,22	0,25	0,23	0,21	0,17	0,15	0,02				
10 <i>Bakeriella erythogasta</i>	0,24	0,24	0,26	0,22	0,25	0,25	0,23	0,28	0,25			
11 <i>Bakeriella bulbosa</i>	0,24	0,24	0,26	0,22	0,25	0,25	0,23	0,27	0,25	0,00		
12 <i>Bakeriella spA</i>	0,21	0,24	0,23	0,21	0,24	0,20	0,21	0,27	0,25	0,18	0,19	
13 <i>Bakeriella spB</i>	0,24	0,22	0,25	0,22	0,23	0,23	0,25	0,27	0,25	0,17	0,17	0,15

Tabela 3.8 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências 28s entre os gêneros de Epyrinae.

1 <i>Holepyris spD</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2 <i>Holepyris A</i>	0,03																	
3 <i>Holepyris spC</i>	0,03	0,02																
4 <i>Holepyris spE</i>	0,03	0,03	0,01															
5 <i>Epyris spC</i>	0,17	0,16	0,16	0,15														
6 <i>Epyris spD</i>	0,17	0,17	0,15	0,15	0,09													
7 <i>Trachepyrus spA</i>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,08	0,10												
8 <i>Trachepyrus spB</i>	0,16	0,16	0,16	0,16	0,10	0,11	0,05											
9 <i>Disepyrus spA</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,11	0,13										
10 <i>Disepyrus spB</i>	0,14	0,14	0,15	0,15	0,13	0,15	0,12	0,14	0,01									
11 <i>Disepyrus spC</i>	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,16	0,17	0,11	0,12								
12 <i>Formosiepyris sp</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,10	0,12	0,04	0,05	0,08							
13 <i>Laelius akares</i>	0,18	0,18	0,17	0,17	0,13	0,13	0,10	0,13	0,16	0,17	0,21	0,15						
14 <i>Laelius pedatus</i>	0,18	0,17	0,17	0,17	0,14	0,15	0,13	0,16	0,17	0,17	0,21	0,16	0,07					
15 <i>Laelius sp</i>	0,19	0,18	0,18	0,18	0,15	0,15	0,12	0,15	0,17	0,18	0,23	0,16	0,05	0,09				
16 <i>Anisepyrus analis</i>	0,19	0,20	0,19	0,19	0,15	0,18	0,16	0,17	0,18	0,18	0,24	0,18	0,12	0,14	0,14			
17 <i>Anisepyrus subviolaceus</i>	0,18	0,18	0,18	0,18	0,15	0,17	0,15	0,16	0,16	0,16	0,23	0,17	0,09	0,11	0,12	0,07		
18 <i>Anisepyrus sp</i>	0,18	0,18	0,17	0,17	0,15	0,16	0,15	0,17	0,16	0,17	0,24	0,17	0,10	0,12	0,12	0,07	0,03	
19 <i>Bakeriella spB</i>	0,24	0,24	0,24	0,23	0,19	0,20	0,19	0,18	0,22	0,22	0,26	0,20	0,19	0,21	0,23	0,24	0,22	0,22

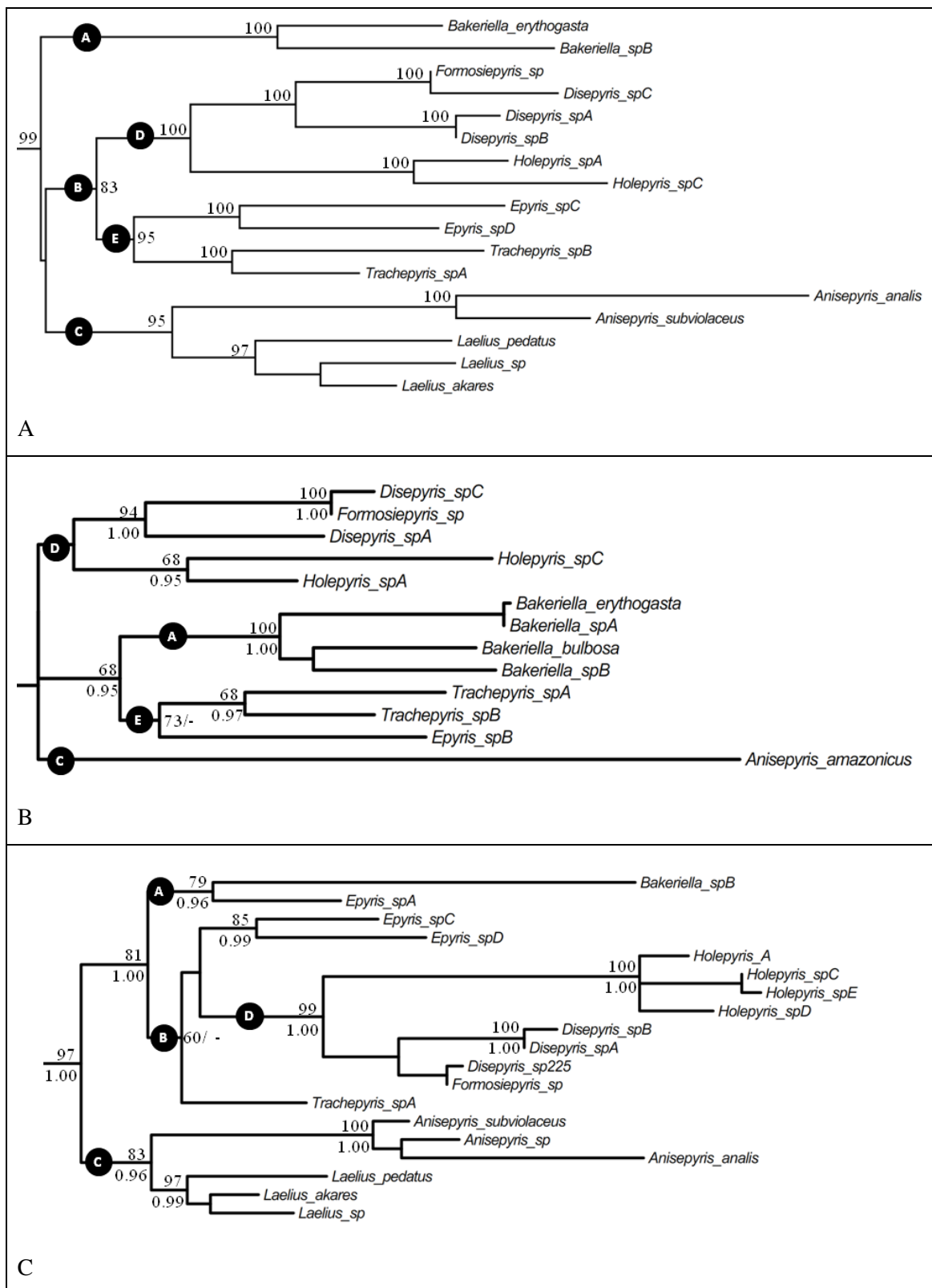


Figura 3.4. Filogenia de Epyrinae: a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *probabilidade a posteriori*.

MESITIINAE E SCLERODERMINAE

Os gêneros de Scleroderminae se agruparam, com alto suporte, aos membros de Mesitiinae tanto na análise concatenada quanto com os genes individualizados (BT>83) e Mesitiinae foram recuperados como monofilético (BT>97). Scleroderminae não foram recuperados como agrupamento monofilético.

Scleroderminae

Na análise com os genes concatenados (Figura 3.5a), Scleroderminae não foram recuperados como grupo monofilético. Os gêneros *Sclerodermus* Latreille, 1809, *Cephalonomia* Westwood, 1833, *Plastonoxus* Kieffer, 1905 e *Prorops* Waterston, 1923 formam um clado monofilético (BT=70). A topologia recuperada para a subfamília indica que *Sclerodermus* (BT=100) agrupa basalmente aos demais gêneros e que *Prorops* não é recuperado como monofilético. *Plastonoxus* é recuperado como grupo-irmão de *Cephalonomia* (BT=87).

Na análise do gene COI (Figura 3.5b), não foi possível recuperar a monofilia da subfamília Scleroderminae e nem inferir a relação entre os gêneros.

Na análise do gene 28S rDNA (Figura 3.5c) Scleroderminae também não foram recuperados como grupo monofilético. Os gêneros *Sclerodermus* (BT=99; PP=1.00), *Allobethylus* Kieffer, 1905 (BT=100; PP=1.00) e *Discleroderma* Kieffer, 1904 (BT=100; PP=1.00) foram recuperados como monofiléticos e a única relação recuperada entre gêneros foi *Plastonoxus* + *Cephalonomia* (BT=99; PP0.98). Na análise do gene ribossomal *Tuberepyris* e *Solepyris* foram recuperados como linhagens dentro de Epyrinae e não como pertencentes a Scleroderminae.

Foram realizadas as análises de Máxima Verossimilhança e Bayesiana com o gene 16S rDNA para estabelecer a posição de *Glenosema*, uma vez que apenas esse gene foi amplificado para esse gênero. Em ambas as análises, espécies de *Glenosema* agruparam com *Rhabdepyris* (BT=100; PP0.98).

Divergência genética dentro de Scleroderminae

Para o cálculo de divergência genética utilizando o gene COI utilizou-se apenas quatro gêneros, com divergência intergenérica variando de 16-26% (Tabela 3.9). As distâncias genéticas intergenérica calculadas para o gene 28S rDNA variaram ente 0.2-21% (Tabela 3.10). A menor divergência intragenérica foi observada para *Cephalonomia* (2%). A divergência intragenérica foi de 6% para *Allobethylus*, 17% para *Prorops*, 1-7% para *Sclerodermus* e 3-13% em *Discleroderma*.

Tabela 3.9 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (588 pb) entre os gêneros de Scleroderminae.

1 <i>Prorops nasuta</i>	1	2	3	4
2 <i>Prorops spA</i>	0,16			
3 <i>Cephalonomia gallicola</i>	0,19	0,17		
4 <i>Sclerodermus sp</i>	0,24	0,20	0,23	
5 <i>Discleroderma_spB</i>	0,21	0,20	0,23	0,26

Tabela 3.10. Estimativa de divergência par- a- entre as sequências de 28S (400pb) para Scleroderminae

1 <i>Cephalonomia stephanoderis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2 <i>Cephalonomia hyalinipennis</i>	0,02										
3 <i>Allobethylus spB</i>	0,10	0,11									
4 <i>Allobethylus spA</i>	0,12	0,13	0,06								
5 <i>Plastonoxus spA</i>	0,06	0,06	0,12	0,14							
6 <i>Sclerodermus sp</i>	0,13	0,14	0,13	0,13	0,16						
7 <i>Sclerodermus guani</i>	0,10	0,11	0,10	0,11	0,13	0,07					
8 <i>Sclerodermus sichuanensis</i>	0,09	0,10	0,09	0,10	0,13	0,06	0,01				
9 <i>Discleroderma spB</i>	0,18	0,18	0,14	0,16	0,18	0,16	0,14	0,13			
10 <i>Discleroderma spA</i>	0,17	0,18	0,15	0,16	0,19	0,14	0,13	0,12	0,03		
11 <i>Prorops nasuta</i>	0,13	0,13	0,15	0,16	0,14	0,18	0,17	0,17	0,18	0,18	
13 <i>Prorops sp</i>	0,12	0,12	0,16	0,17	0,13	0,20	0,18	0,17	0,21	0,22	0,17

Mesitiinae

Na análise concatenada (Figura 3.5a) Mesitiinae formam um grupo monofilético, dividido em clados A e B. O clado A (BT=92) se divide no clado C representado pelos gêneros *Heterocoelia* Dahlbom, 1854 e *Mettrionotus* Móczár, 1970 e clado D por *Pseudomesitius* Móczár, 1970, *Ukayakos* Argaman, 2003 e *Sulcomesitius* Móczár, 1970. O clado B (BT=95) é formado por *Zimankos* Argaman, 2003, *Mesitius* Spinola, 1851, *Itapayos* Argaman, 2003 e *Pilomesitius* Móczár, 1970.

Na análise do gene COI (Figura 3.5b) o arranjo dos clados A e B são mantidos (BT=87; PP=0.99), assim como a subdivisão em clados D e C (BT=64; PP=0.96), embora com baixo suporte para o clado D.

Na análise do gene 28S rDNA, a formação dos clados A e B não é nítida. *Mesitius* é recuperado como grupo-irmão de *Clytovorus* Nagy, 1972 (BT=100; PP=1.00), *Codorcas* Nagy, 1972 como grupo-irmão de (*Itapayos*+*Zimankos* +*Pilomesitius*) (BT=88; PP=0.99), foi possível estabelecer o clado C com *Heterocoelia* grupo-irmão de *Sulcomesitius* spC (BT=68; PP<95) e o agrupamento monofilético *Sulcomesitius* sp (A e B)+*Ukayakos* (BT=100; PP=1.00).

Sulcomesitius, dessa maneira, foi recuperado como polifilético. A posição de *Metrionotus* e *Pseudomesitius* em relação aos demais gêneros é indeterminada.

Divergência genética dentro de Mesitiinae

A divergência genética utilizando o marcador COI (Tabela 3.11) variou de 2-21%. A menor divergência foi encontrada entre os representantes de Heterocoelia (2%), entre os demais representantes da subfamília os valores de distância genética variaram entre 18-21%.

A divergência genética calculada entre os gêneros de Mesitiinae para o gene 28S rDNA variou entre 0.01% até 8% (Tabela 3.12). As divergências intragenérica no clado D foram as menores (0.01%), por outro lado, esses três gêneros apresentaram altas divergências com os demais gêneros (6-8%). O exemplar *Sulcomesitius* spC apresentou divergência alta entre os demais representantes do gênero *Sulcomesitius* e *Ukayakos* (6%).

Tabela 3.11 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de COI (588 pb) entre os gêneros de Mesitiinae.

1 <i>Heterocoelia</i> spA	1	2	3	4	5	6	7
2 <i>Heterocoelia</i> spB	0,02						
3 <i>Zimankos shianaka</i>	0,19	0,19					
4 <i>Pseudomesitius</i> sp	0,18	0,18	0,20				
5 <i>Mesitius absents</i>	0,19	0,20	0,16	0,18			
6 <i>Metrionotus</i> spA	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21		
7 <i>Sulcomesitius</i> spA	0,19	0,19	0,20	0,19	0,20	0,20	
8 <i>Pilomesitius</i> sp	0,18	0,18	0,15	0,20	0,14	0,22	0,18

Tabela 3.12 Estimativa de divergência par- a-par entre sequências de 28S rDNA (501 pb) entre os gêneros de Mesitiinae.

1 <i>Sulcomesitius</i> spA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2 <i>Sulcomesitius</i> spB	0,00													
3 <i>Sulcomesitius</i> spC	0,06	0,06												
4 <i>Pseudomesitius</i> sp	0,07	0,06	0,03											
5 <i>Heterocoelia</i> spB	0,07	0,06	0,01	0,04										
6 <i>Heterocoelia</i> spA	0,07	0,06	0,01	0,04	0,00									
7 <i>Metrionotus</i> spB	0,06	0,05	0,01	0,03	0,02	0,02								
8 <i>Metrionotus</i> spA	0,06	0,05	0,01	0,03	0,02	0,02	0,00							
9 <i>Clytrovorus</i> sp	0,08	0,08	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04						
10 <i>Mesitius</i> sp	0,08	0,08	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02					
11 <i>Itapayos</i> sp	0,08	0,08	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0,05				
12 <i>Ukayakos</i> sp	0,00	0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,08	0,08	0,08			
13 <i>Pilomesitius</i> sp	0,07	0,07	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,05	0,04	0,01	0,07		
14 <i>Zimankos shianaka</i>	0,07	0,07	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,05	0,04	0,01	0,07	0,00	
15 <i>Codorcas</i> sp	0,06	0,06	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,02	0,06	0,01	0,01

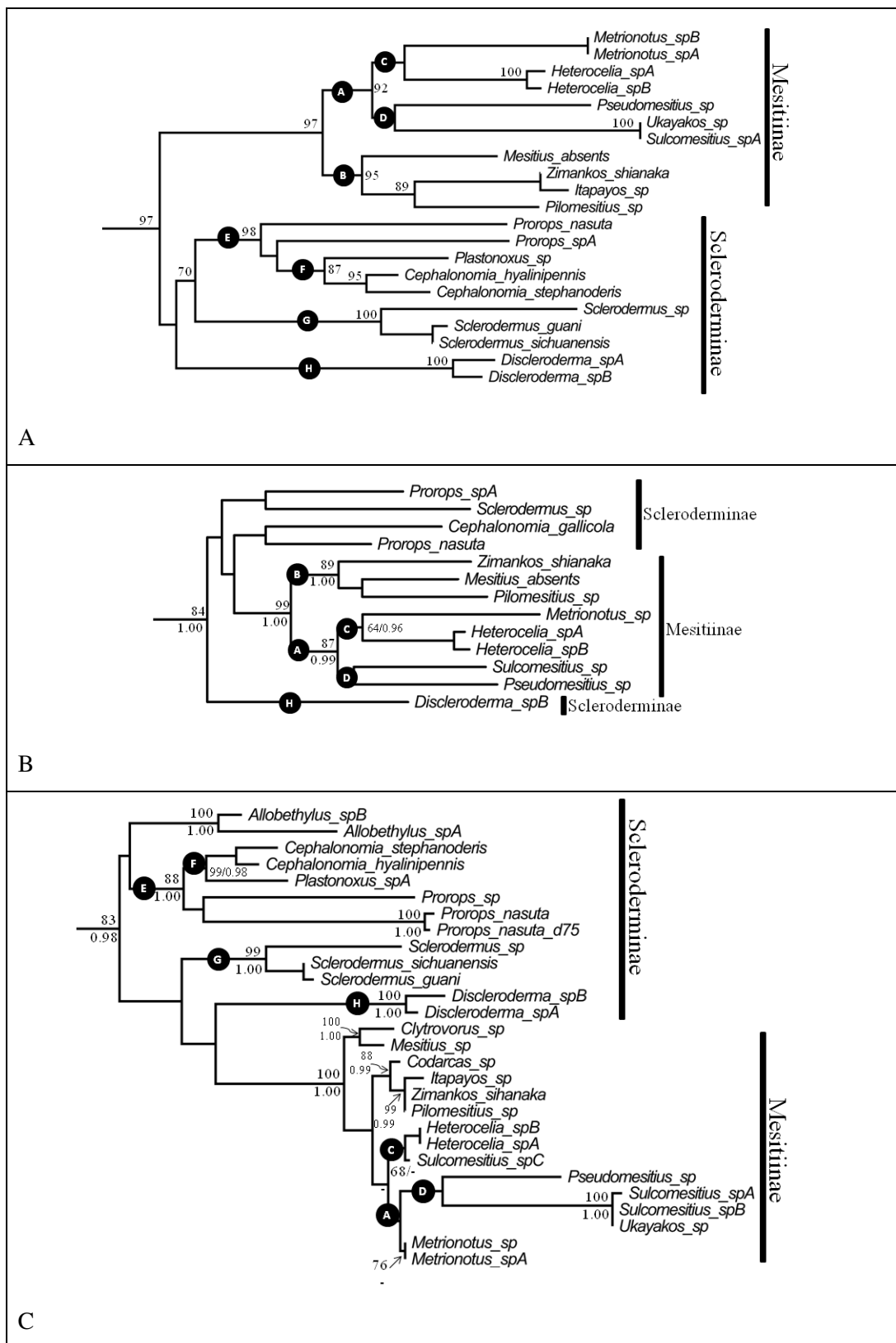


Figura 3.5. Filogenia de Mesitiinae e Scleroderminae a) Topologia obtida através de análise combinada dos genes COI e 28S rDNA; b) análise obtida com o gene COI e c) com o gene 28S rDNA. Valores acima dos ramos são referentes *Bootstrap* (1000 replicações) e abaixo referente à *Probabilidade a Posteriori*.

DISCUSSÃO

BETHYLINAE

O primeiro estudo filogenético envolvendo gêneros de Bethylinae realizado por Polaszek & Krombein (1994) utilizou *Lytopsenella* como o grupo externo, desse modo, não puderam estabelecer a monofilia da subfamília. O segundo trabalho envolvendo os gêneros de Bethylinae fez a polarização dos caracteres baseado em um ancestral hipotético, com todos os estados iguais a zero (Terayama, 1995a) e, assim, a monofilia da subfamília continuou sendo questionada.

Dez anos mais tarde, foi realizado o primeiro estudo entre os gêneros de Bethylinae polarizando os caracteres utilizando um grupo externo real (Ploeg & Nel, 2004), apontando a monofilia de Bethylinae e propondo que a presença das garras tarsais fortemente curvadas e a presença de um forte entalhe na margem anterior perto da base das asas posteriores fossem as sinapomorfias para a subfamília.

Carr *et al.* (2010) avaliaram com dados moleculares a posição de somente três gêneros da subfamília (*Bethylus*, *Odontepyrus* e *Goniozus*), comprovando a monofilia da subfamília.

Desde então, nenhum estudo cladístico foi realizado envolvendo os demais gêneros de Bethylinae.

Eupsenella e *Lytopsenella*

Todos os trabalhos cladísticos envolvendo Bethylinae recuperaram *Lytopsenella* e *Eupsenella* em uma politomia basal ao clado formado pelos demais gêneros de Bethylinae.

Lytopsenella e *Eupsenella* possuem as características consideradas primitivas para toda a família, como número de palpos maxilares igual a seis, presença do notaulice, célula marginal aberta e presença da célula submarginal (Polaszek & Krombein, 1994). Os dois gêneros são os únicos de Bethylidae que possuem seis células fechadas nas asas anteriores (Azevedo, 2009).

A característica que difere *Lytopsenella* e *Eupsenella* é a presença da célula marginal alongada em *Lytopsenella*. Esse gênero sempre foi considerado como sendo o gênero mais basal não só de Bethylinae, mas também de toda a família (Evans, 1964; Sorg, 1988).

Em nosso trabalho obtivemos resolução para apontar pela primeira vez que *Lytopsenella* como grupo-irmão de *Eupsenella*, e os dois gêneros em uma posição basal em relação aos demais gêneros de Bethylinae, concordando como o proposto anteriormente.

Relação dentro do clado B

A relação entre os gêneros *Odontepyris*, *Prosierola*, *Goniozus*, *Bethylus* e *Sierola* foi investigada inicialmente por Polaszek & Krombein (1994) e Ploeg & Nel (2004), que mostraram que *Odontepyris* é grupo-irmão de *Prosierola* e que *Bethylus* é grupo-irmão de *Sierola*. Terayama (1995a), por sua vez, obteve uma topologia com menor resolução dentro desse clado, conseguindo recuperar apenas a relação de *Odontepyris* e *Prosierola* entre a politomia formada pelos demais gêneros do clado. Carr *et al.* (2010) avaliaram a posição de *Bethylus*, *Odontepyris* e *Goniozus* e apresentaram a relação mais próxima de *Odontepyris* com *Goniozus*, distinto do que observado anteriormente.

Bethylus e Sierola

Nossos dados não confirmam a formação do clado *Bethylus* + *Sierola*, previamente recuperados como grupo-irmão nos estudos morfológicos de Polaszek & Krombein (1994) e Ploeg & Nel (2004). Esse agrupamento foi baseado nas sinapomorfias redução do número dos segmentos dos palpos labiais de três para dois segmentos e presença da nervura radial fortemente angulada.

Em nossa análise, *Bethylus* e *Sierola* foram recuperados em uma politomia basal ao clado formado por *Goniozus*, *Prosierola* e *Odontepyris*. Do mesmo modo, a relação de *Bethylus* e *Sierola* como grupo-irmão de *Goniozus*, como apontado por Polaszek & Krombein (1994) e Ploeg & Nel (2004), não foi recuperada. A única sinapomorfia utilizada por esses autores para estabelecer o agrupamento (*Goniozus*+ (*Bethylus*+*Sierola*)) seria o estado de caráter ausência da faixa esculpida frontalmente, que se estende da carena do clipeo até os ocelos frontais, geralmente encontrados em outros táxons de Bethylinae.

Goniozus e Parasierola

Em comparação com outras subfamílias, Bethylinae passou por poucas mudanças desde a revisão de Kieffer (1914) em relação à taxonomia dos gêneros, a maior controvérsia ocorreu em torno de *Goniozus*, *Parasierola* e *Perisierola* Kieffer, 1914.

Brues (1907) nomeou *Parasierola* como espécies com e sem areolete e com uma ou mais carenas longitudinais no propódeo. Desconsiderando a decisão de Brues, Kieffer atribuiu o nome de *Perisierola* às espécies que possuem a célula discoidal (areola) e de *Goniozus* àquelas sem a célula discoidal. Mais tarde, Muesebeck (1940) desconsidera a proposição de Kieffer e mantém a de Brues.

Assim, uma questão da literatura era se *Parasierola* e *Goniozus* são sinônimas. Evans (1978) sinonimizou *Parasierola* e *Perisierola* em *Goniozus*, caracterizada como uma espécie que possui a célula discoidal fechada (areolete) ou não.

Em nosso estudo, confirmamos a sinonímia de *Parasierola* e *Goniozus*, concordando com a proposta de Evans (1978) de que o areolete fechada ou aberta não representa uma sinapomorfia para o grupo. Por outro lado, nossos dados não recuperaram *Goniozus* como um agrupamento monofilético, sendo recuperado em dois clados distintos (clados D e G). A divergência, entre representantes desse clado é maior do que com outros gêneros.

Goniozus é o único gênero cosmopolita e o segundo maior em número de espécies. Considerando que os gêneros de Bethylinae são poucos diversos e especiosos, com exceção de *Sierola*, é plausível que mais de uma espécie esteja sob o epíteto *Goniozus*.

A sinapomorfia de *Goniozus* foi definida pelo caráter redução da quilha do pecíolo por Polaszek & Krombein (1994). Os autores ressaltam que caracteres do pecíolo nunca haviam sido utilizados para definir gêneros de Bethylinae, mas foi necessário recorrer a esse caráter para diferenciar *Goniozus*.

É possível também que nos trabalhos cladísticos prévios com dados morfológicos tenham sido utilizados para representar *Goniozus* representantes das duas linhagens distintas, causando a dificuldade para definir a sinapomorfia do gênero e levando a uma topologia equivocada.

Considerando a grande distribuição geográfica, o grande número de espécies, a alta divergência dentre as espécies do gênero e a divisão do gênero em mais de uma linhagem é possível sugerir que o epíteto *Goniozus* representa mais de um gênero e merece uma revisão taxonômica.

Goniozus, Prosierola e Odontepyris

Nossos dados corroboram o relacionamento mais próximo entre *Goniozus*, *Odontepyris* e *Prosierola*, como proposto pela filogenia molecular de Carr *et al.* (2010), ao invés do compartilhamento de um ancestral comum entre *Goniozus*, *Bethylus* e *Sierola*, baseado em dados morfológicos. Nossos resultados discordam do proposto por Polaszek & Krombein (1994) e Ploeg & Nel (2004) e não recuperam a relação entre *Prosierola*+*Odontepyris* que foi sugerida pelos autores baseada em no mínimo quatro sinapomorfias.

A possibilidade de uma relação mais estreita entre *Goniozus* e *Prosierola* devido ao compartilhamento do propódeo esfumado foi tratada como homoplasia por Polaszek & Krombein (1994). A ausência da carena propodeal longitudinal compartilhada pelos dois gêneros observada na matriz de caracteres mostrada por Polaszek & Krombein (1994) também poderia ser considerada uma indicação da proximidade dos dois gêneros.

PRISTOCERINAE

Sorg (1988) publicou o que seria o primeiro trabalho de filogenia de Pristocerinae, porém usou somente cinco gêneros: *Pseudisobrachium*, *Dissomphalus*, *Acrepyris* (então tratado como *Pristocera*), *Apenesia* e *Parascleroderma*. Nesse estudo, Sorg relatou *Pseudisobrachium* como o mais basal dentro de Pristocerinae e grupo-irmão do clado formado por (*Dissomphalus*+*Acrepyris*+ (*Parascleroderma*+*Apenesia*)).

Terayama (1996) realizou um estudo filogenético mais abrangente para Pristocerinae envolvendo 17 dos 22 gêneros válidos na época. Porém, o autor utilizou como grupo externo um ancestral hipotético que apresenta o estado plesiomórfico para todos os caracteres. Dos 49 caracteres analisados em seu trabalho, somente 27 eram informativos.

O estudo molecular de Carr *et al.* (2010) tinha como principal objetivo testar a monofilia das subfamílias e incluiu apenas cinco gêneros de Pristocerinae (*Dissomphalus*; *Foenobethylus*, *Pristocera*: *Pseudisobrachium* e *Trichiscus*), confirmando a monofilia de Pristocerinae.

Caloapenesia, Gênero nov. e *Pseudisobrachium*

Nossas análises indicam que *Caloapenesia*, Gênero nov. e *Pseudisobrachium* são os gêneros basais de Pristocerinae. O agrupamento desses três gêneros pode ser confirmando pelo compartilhamento da característica parâmeros duplos, dividido em dois ramos (Kieffer, 1904; Evans, 1961 e Terayama, 1995b). O gênero novo identificado por Gobbi (*in prep*) foi caracterizado por também possuir parâmeros duplos, confirmando a estreita relação entre esses gêneros.

Verificamos, ainda, que *Caloapenesia* e Gênero nov. são mais relacionados entre si do que com *Pseudisobrachium*. Gobbi (2013) também apontou em dados morfológicos a maior relação entre *Caloapenesia* e Gênero nov. por possuírem parâmero dorsal mais largo, reto e menos esclerotizado em comparação com *Pseudisobrachium* que possui parâmero dorsal estreito, suavemente dobrado e muito esclerotizado.

Além disso, Gênero nov. compartilha similaridades do hipopégio com *Caloapenesia*, que diferem do resto de Pristocerinae, justificando dessa forma, o agrupamento Gênero nov. + *Caloapenesia*.

Terayama (1996), por sua vez, recuperou *Pseudisobrachium* como grupo-irmão de *Protisobrachium*, sustentado por olhos pilosos e disco propodeal mais longo que largo. De fato, *Protisobrachium* tem caracteres muito semelhante a *Pseudisobrachium*, provavelmente causado pelo alongamento geral do corpo. Porém, a presença de olhos pilosos e disco propodeal longo

estão presentes em muitos outros gêneros, inclusive *Caloapenesia* (Terayama, 1995b). Ainda, Terayama (1996) não investigou profundamente a presença de parâmeros duplos como uma possível sinapomorfia para a relação entre *Caloapenesia* e *Pseudisobrachium*, e este caráter foi recuperado em sua análise como uma homoplasia.

Pseudisobrachium, *Caloapenesia* e *Gênero nov.* apresentaram grande divergência genética (19-30% no gene 28S rDNA e 53% para o gene COI) em relação aos demais gêneros de *Pristocerinae*. Essas sequências extremamente divergentes dos demais membros de *Pristocerinae*, observadas nos dois marcadores, sugere que esses gêneros pertencem a uma linhagem que se separou precocemente das demais.

No estudo de Carr *et al.* (2010) *Pseudisobrachium* é grupo-irmão de *Foenobethylus* e do agrupamento *Dissomphalus* + *Trichiscus*. Ao inserirmos a sequência do gene 28S rDNA do exemplar de *Pseudisobrachium* utilizado por Carr *et al.* (2010) em nossas análises verificamos alta divergência com as sequências de *Pseudisobrachium* de nossa amostra. Porém, a divergência de *Pseudisobrachium* de Carr *et al.* (2010) e *Pristocera* é 2%, enquanto com *Pseudisobrachium* de nossa amostra foi 17%. Esses dados nos levam a propor que o exemplar de *Pseudisobrachium* de Carr *et al.* (2010) tenha sido erroneamente identificado, e deva se referir a *Pristocera*.

Apenesia, *Parascleroderma* e *Foenobethylus*

Apenesia + (*Parascleroderma* + *Foenobethylus*) formaram um grupo monofilético (clado D). Essa relação de *Apenesia* com *Parascleroderma* e *Foenobethylus* já havia sido verificada previamente com dados morfológicos de Sorg (1988), que apontou a relação mais próxima entre *Apenesia* e *Parascleroderma* e do trabalho de Gobbi (2013) que também recuperou membros de *Apenesia* do grupo *laevigata* como grupo-irmão de *Foenobethylus* + *Parascleroderma*.

Foenobethylus foi descrito baseado em uma única espécie por Kieffer (1913), e permaneceu negligenciado, sem ser classificado em nenhuma subfamília até 2007. Várkonyi & Polaszek (2007) redescreveram o gênero, alocando-o em *Pristocerinae*. Utilizando os caracteres de Terayama (1996) esses autores discutiram que *Foenobethylus* poderia ser mais relacionado ao clado formado por *Afgoiogfa* Argaman, 1988 e *Parascleroderma*, por compartilhar a sinapomorfia de perda da nervura metacarpo.

Azevedo & Lanes (2007) discutiram o compartilhamento de caracteres entre *Afgoiogfa*, *Foenobethylus* e *Parascleroderma*, a saber, a propleura exposta, nervura basal oblíqua e longe do estigma, metacarpo ausente na asa anterior, declividade propodeal sem carena mediana; edeago giboso e cilíndrico, e apontaram que os três gêneros seriam relacionados entre si.

Todas as nossas análises recuperaram *Foenobethylus* como grupo-irmão de *Parascleroderma*, confirmado que esses dois gêneros compartilham um ancestral comum exclusivo.

Ainda, na análise com o gene COI, *Apenesia* aparece parafilético em relação à *Neoapenesia*. Na análise de divergência genética, *Apenesia* do clado D é divergente em 12-26% em relação à *Neoapenesia*, comparado com 15-26% em relação a outros exemplares de *Apenesia*, confirmando a proximidade entre *Neoapenesia* e *Apenesia*. O gênero *Neoapenesia* foi descrito por Terayama (1995b) a partir de um único espécime e o autor não se atentou ao fato de que o gênero novo descrito por ele era muito semelhante a algumas espécies de *Apenesia* do grupo laevigata.

Gobbi (2013) em seu estudo cladístico recuperou *Apenesia* como polifético, a formação de um clado de *Apenesia* do grupo laevigata com *Neoapenesia* e outro clado de *Apenesia* mais relacionado com *Pristocera*. Nossos dados corroboram para a sinonimização de *Apenesia* do grupo laevigata e *Neoapenesia*.

Dissomphalus, Trichiscus e Protisobrachium

Em nosso estudo *Dissomphalus* foi recuperado como grupo-irmão de *Trichiscus* na análise concatenada e na análise gerada com dados de 28S rDNA. Ainda observamos o agrupamento entre *Dissomphalus, Trichiscus e Protisobrachium*, porém a posição de *Protisobrachium* como basal a *Dissomphalus+Trichiscus* apresenta baixo suporte.

Na análise com o gene COI, envolvendo mais representantes do gênero *Protisobrachium*, essa relação não é recuperada. *Trichiscus* é mais basal e grupo-irmão do clado contendo *Dissomphalus, Protisobrachium e Pristocera*.

O gênero *Dissomphalus* era caracterizado pela presença de dois processos tergaais no segundo tergito metasomal dos machos (Evans 1964). O gênero *Trichiscus* é diferenciado de *Dissomphalus* apenas por apresentar um par de processos tergaais no terceiro tergito metasomal dos machos, em vez de apresentar no segundo tergito, mas compartilha uma série de caracteres com *Dissomphalus*. Azevedo (2003) propõe que algumas espécies de *Dissomphalus* perderam este caráter e poderiam ser erroneamente identificadas como *Apenesia* ou *Pseudisobrachium*. Desse modo, a existência de *Dissomphalus* sem processo tergal fez com que Azevedo (2003) sugerisse que a divisão do edeago dividido em ramo ventral e corpo dorsal fosse adotada como a principal delimitação do gênero, independente da presença do processo tergal. Entretanto, esse caráter também é encontrado em *Protisobrachium* e *Trichiscus*. Desse modo pode se suspeitar que a divisão do edeago surgiu em um ancestral comum a *Protisobrachium, Dissomphalus e Trichiscus*.

Terayama (1996) também recuperou *Dissomphalus* como grupo-irmão de *Trichiscus*, e esse clado irmão do clado formado por *Pseudisobrachium*, *Protisobrachium* e *Neoapenesia*, agrupados por características do mesossomo, em especial a ausência dos notáulices. Entretanto, espécies de *Pseudisobrachium* da região Neotropical apresentam notáulices, inviabilizando a sinapomorfia apontada para o clado proposto por Terayama (1996).

Gobbi (2013) ressalta que *Protisobrachium* apresenta um alongamento corporal, e muitos caracteres alongados, como por exemplo, comprimento da cabeça, comprimento da antena, comprimento do disco pronotal, comprimento do discopropodeal, acentuam as diferenças de *Protisobrachium* em relação aos outros dois gêneros, fazendo com que os três gêneros concentrem muitas diferenças referentes ao corpo. Desse modo, esses caracteres não seriam os ideais a serem escolhidos ao estudar a relação entre esses três gêneros.

Em sua análise, Gobbi (2013) recuperou o clado *Protisobrachium*, *Dissomphalus* e *Trichiscus* baseado na sinapomorfia da genitália: edeago dividido em dois ramos, sugerindo que a característica da genitália seria mais apropriada para caracterizar o grupo.

Apesar de não estabelecermos a posição de *Protisobrachium* em relação *Dissomphalus* e *Trichiscus* com suporte em nossas análises, nossos dados apontam que esse três gêneros pertencem a uma mesma linhagem dentro de *Pristocera*, que inclui além desses três gêneros, *Pristocera*.

Curiosamente, todos esses gêneros apresentam o edeago dividido em duas estruturas: *Protisobrachium*, *Dissomphalus* e *Trichiscus* são caracterizados pelo edeago dividido em dois ramos, enquanto que *Pristocera* apresenta o edeago dividido em duas valvas. Assim, nossa proposta é de que essas estruturas possam ser homólogas e possivelmente “edeago dividido em duas estruturas” seja definida como uma sinapomorfia do grupo.

Pristocera, *Kathepyris* e *Acrepyris*

Na análise com o gene 28S rDNA, *Pristocera*, *Kathepyris* e *Acrepyris* estão intimamente associados e *Pristocera* é parafilético em relação a *Kathepyris* e *Acrepyris*. Na análise com o gene COI, a relação *Acrepyris* e *Pristocera* não foi esclarecida.

Evans (1964) tratou *Acrepyris* como um subgênero de *Pristocera*. Posteriormente, Terayama (1996) elevou o *status* de *Acrepyris* para um gênero distinto separado de *Pristocera* baseados nos caracteres cerdas eretas na antena (presente em *Pristocera* e ausente em *Acrepyris*), hipopégio dividido em duas lamina em *Pristocera* e consistente em uma única lamina em *Acrepyris* e edeago dividido em três valvas em *Acrepyris* e em uma valva em *Pristocera*.

Zamprogno & Azevedo (*in press*) confirmam a manutenção desses gêneros como táxons distintos baseados nas características do edeago e hipopégio, ressaltando que a presença de cerdas eretas nas antenas não pode ser considerada uma sinapomorfia para *Pristocera*.

Nossos dados não confirmam a manutenção de *Acrepyris* e *Pristocera* como táxons distintos. A análise do gene 28S aponta para a sinonímia entre esses dois gêneros, enquanto que a análise com os genes concatenados não é conclusiva. Os dados de divergência genética indicam uma proximidade maior entre *Acrepyris* e espécies de *Pristocera* quando comparado com outras espécies de *Pristocera*. Esses dados apontam a necessidade de um estudo molecular mais abrangente para o esclarecimento da relação entre esses dois gêneros.

Os gêneros *Pristocera* e *Kathepyris* são diferenciados apenas pelo grau de extensão e conspicuidade das nervuras M e Cu1 nas asas dianteiras, que em *Kathepyris* atingem a margem apical e em *Pristocera* não atingem (Terayama 1996). Na descrição do gênero de *Kathepyris*, Benoit (1982) cita que a genitália do exemplar seria muito similar com as do gênero *Pristocera* demonstrando a similaridade entre esses dois gêneros. Nossos dados corroboram os achados de Zamprogno & Azevedo (*in press*) que afirmam a parafilia de *Pristocera* em relação à *Kathepyris*, sinonimizando o último com *Pristocera*.

Apenesia, um grupo distinto de *Acrepyris* e *Pristocera*

A semelhança entre *Apenesia*, *Acrepyris* e *Pristocera* é relatada muitas vezes ao longo da literatura, ao ponto de Finnamore & Gauld (1995) sinonimizarem todas as espécies de *Apenesia* para *Pristocera*. Os gêneros *Apenesia*, *Acrepyris* e *Pristocera* compartilham apenas caracteres corporais, embora os únicos edeagos divididos em valvas sejam de *Acrepyris* e *Pristocera* (Terayama, 2003a). Terayama & Yamane (1998) também questionaram o relacionamento de *Apenesia* e *Acrepyris* com *Pristocera*.

Nossos dados indicam uma divisão clara entre a linhagem de *Apenesia* e *Pristocera*, tanto com o gene mitocondrial quanto com o gene ribossomal. *Apenesia* é recuperado na linhagem formado por *Foenobethylus* e *Parascleroderma* (clado D). *Pristocera* e *Acrepyris*, por outro lado, aparecem como membro da linhagem que contém *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium* (clado E).

EPYRINAE

A subfamília Epyrinae é a mais problemática dentro de Bethylidae, pois devido à sua grande plasticidade é difícil a delimitação dos gêneros. A representatividade da subfamília é restrita na maioria dos estudos, e as análises cladísticas não esclareceram a relação entre os gêneros (Waichert & Azevedo, 2009).

Soma-se ainda a proposta de Evans (1964) que incluiu Scleroderminae dentro de Epyrinae, com a subdivisão em três tribos (Epyrini+Sclerodermini+Cephalonomiini), gerando uma complexidade ainda maior para a escolha de caracteres morfológicos nos estudos cladísticos. Essa classificação confusa só começou a ser desfeita em 2008, no trabalho de Lanes & Azevedo (2008) que sinonimizaram Cephalomini com Sclerodermini e finalizou com Alencar & Azevedo (2013) que elevaram Sclerodermini e Epyrini ao status de subfamília.

Concordante com a proposta de separação de Epyrinae e Scleroderminae foi o estudo que envolveu análises moleculares (Carr *et al.*, 2010) que utilizou quatro gêneros para representar a subfamília. Epyrinae, entretanto, permaneceu sem delimitação cladística até o desenvolvimento do trabalho de Alencar & Azevedo (2013) que apontaram pela primeira vez uma sinapomorfia para a subfamília.

Nossos dados apontam para a monofilia de Epyrinae, concordante com a proposta de Carr *et al.* (2010), e a existência de três clados principais, que são equivalente a grupos monofiléticos recuperados no estudo morfológico desenvolvido por Alencar & Azevedo (2013).

Laelius e Anisepyrus

Waichert & Azevedo (2009) e Alencar & Azevedo (2013) já haviam evidenciado que *Laelius* seria grupo-irmão de *Anisepyrus*. De acordo com Alencar & Azevedo (2013) esses dois gêneros compartilham as autapomorfias porção apical da margem lateral do hipopigio longa, cavidade subapical no edeago e a margem lateral do edeago alargado basalmente.

Holepyrus, Formosiepyrus e Disepyrus

Nossos dados demonstram uma relação estreita entre *Holepyrus*, *Formosiepyrus* e *Disepyrus* e mostram a parafilia de *Disepyrus* em relação à *Formosiepyrus*. A relação estreita entre esses gêneros e a possibilidade de sinonímia de *Formosiepyrus* em *Disepyrus* não é novidade na literatura.

Quando Terayama (2004) descreveu *Formosiepyrus* indicou a possibilidade da proximidade cladística com *Disepyrus* devido ao compartilhamento dos olhos alongados e a presença da depressão medial no mesocuto.

Esses três gêneros compartilham um padrão corporal similar, pois todos possuem o clípeo trilobado e sulco escutelar bem definido (Alencar & Azevedo, 2013). Nesse estudo, Alencar & Azevedo (2013) já haviam ressaltado a dificuldade de delimitação cladística desses táxons e sugerido que um estudo mais abrangente poderia levar a sinonímia dos três gêneros.

Uma sinapomorfia apontada para *Formosiepyrus* por Alencar & Azevedo (2013) foi a presença de uma projeção na carena occipital, muito embora os autores tenham considerado que

seria necessário a confirmação dessa sinapomorfia em outras espécies do gênero, pois seu grupo de estudo envolveu somente exemplares da Malásia. Outra sinapomorfia apontada pelos autores para o gênero foi a margem da fóvea posterolateral projetada para cima, que apesar de diagnóstica para o gênero segundo Terayama (2004), pode ser uma condição comum entre as espécies de Epyrinae que possuem o disco pronotal esculpido em formatos de linhas.

Considerando a fragilidade das sinapomorfias apontadas para *Formosiepyris*, nossos resultados reafirmam a proposta de sinonímia entre *Disiepyris* e *Formosiepyris*.

Por outro lado, nossos dados apontam *Holepyris* como monofilético com alto suporte mesmo sendo composto de exemplares de localidades muito distintas como do Vietnã, Emirados Árabe e África do Sul, não dando suporte para a proposta de Alencar & Azevedo (2013) de sinonímia entre os três gêneros.

Epyris e *Bakeriella*

Nossos dados recuperaram *Epyris* como polifilético, agrupado com *Bakeriella* e com *Trachiepyris*, concordante com dados da literatura que questionam a monofilia de *Epyris* (Carpenter, 1999; Evans, 1964).

Primeiramente, a descrição de *Epyris* feita por Westwood (1832) é curta e usa somente caracteres de coloração, considerados obsoletos para a identificação do gênero por Waichert & Azevedo (2009). Carpenter (1999) já apontava para a parafilia do gênero e indicou que *Epyris* seria um agrupamento de várias espécies que não se encaixam em nenhum outro gênero. Atualmente o gênero não possui nenhuma sinapomorfia (Alencar & Azevedo, 2013).

O fato de *Epyris* ser o gênero mais especioso de Epyrinae, com 275 espécies e de ocorrer em todas as regiões zoogeográficas (Alencar & Azevedo, 2013) parece mais um indício que a designação dada a esse táxon se refere a mais de um gênero.

Bakeriella é um gênero facilmente reconhecido, mas com limite taxonômico mal definido, compartilhando várias características com *Epyris* (Alencar & Azevedo, 2013). De maneira recorrente estudos cladísticos apontam *Bakeriella* como uma linhagem de *Epyris*. Evans (1964) já havia indicado a proximidade de *Epyris* e *Bakeriella* afirmando que *Bakeriella* se originou a partir de uma linhagem de *Epyris*. Sorg (1988) foi o primeiro a recuperar em um estudo cladístico *Bakeriella* como uma linhagem descendente de *Epyris*.

No trabalho de sistemática apresentado por Alencar & Azevedo (2013) foram propostas três relações distintas entre *Bakeriella*: como grupo-irmão de *Epyris*, em uma relação politômica com *Epyris* e *Trachiepyris* e ainda como uma linhagem de dentro de *Epyris*. No trabalho de Waichert & Azevedo (2009), *Bakeriella* também foi recuperado como uma linhagem de *Epyris*. *Bakeriella* se assemelha a *Epyris* por possuir cabeça tão longa quanto larga, escutelo com a

fóvea bem delimitada e não conectada por um sulco e genitália masculina com edeago curto, porém *Bakeriella* é restrito ao novo mundo.

Nos estudos prévios realizados foi observado que *Bakeriella*, que é restrito ao Novo Mundo, se agrupa com *Epyris* de várias partes do Mundo: Oriental, Paleártica e Etiópica, Assim, não há distinção zoogeográfica para esse agrupamento, destacando a necessidade de um estudo abrangente que defina e delimite morfologicamente os agrupamentos observados nos estudos moleculares.

MESITIINAE E SCLERODERMINAE

O agrupamento Mesitiinae e Scleroderminae recuperado no presente trabalho foi relatado pela primeira vez por Carr *et al.* (2010). Nenhum estudo cladístico com dados morfológicos havia apontado o relacionamento dessas duas famílias e, até o momento, não existe uma sinapomorfia para definir esse agrupamento.

SCLERODERMINAE

O agrupamento Scleroderminae não apresentou suporte em nenhuma das análises. *Cephalonomia*, *Plastonoxus* e *Prorops* foram recuperados no mesmo clado. A sinapomorfia desses três gêneros é a presença de 12 segmentos antenais (Evans, 1964). Nossos dados estão de acordo com o estudo de Carr *et al.* (2010), que recuperou o grupo com alto suporte, porém incluiu *Discleroderma*. Lanes & Azevedo (2008) analisaram *Cephalonomia* e *Plastonoxus* e seus dados recuperaram o agrupamento monofilético, apontando a sinapomorfia "antenas com 12 segmentos" e "asas dianteiras com longas cerdas marginais".

Pela primeira vez indicamos *Allobethylus* e *Sclerodermus* como grupo-irmão. Lanes & Azevedo (2008) e Carr *et al.* (2010) não obtiveram suporte para definir as relações entre esses gêneros.

Discleroderma não apresenta suporte para ser agrupados com membros de Scleroderminae, permanecendo em uma posição não definida dentro do agrupamento Scleroderminae +Mesitiinae.

Em nossa análise (arvore não mostrada), *Tuberepyris*, *Solepyris* e *Glenosema* não foram recuperados dentro de Scleroderminae, mas como membros de Epyrinae. *Glenosema elevata* foi recuperado como grupo-irmão de *Rhabdepyris*. *Tuberepyris* e *Solepyris* foram recuperados dentro do clado contendo *Trachepyris* e *Epyris*. Lanes & Azevedo (2008) já haviam indicado que *Glenosema viduatus* pertenceria a Epyrinae, e que não possuía as sinapomorfias "mandíbulas com sete dentes apicais" e "margem superior da mandíbula denteada", presentes

nas outras espécies de *Glenosema* analisadas e mantidas em Scleroderminae. *Glenosema viduatus* foi justificada pelos autores como pertencente a Epyrinae devido a características como "local de inserção antenal, clípeo longo e carena mediana do clípeo alta".

Nossos dados também posicionaram *Glenosema elevata* dentro de Epyrinae, ampliando o questionamento sobre a posição do gênero como um todo em Scleroderminae.

Os estudos cladísticos envolvendo gêneros de Scleroderminae podem ter sido prejudicados pela escolha dos caracteres, pois todos os estudos sistemáticos envolvendo a subfamília consideravam, equivocadamente, a subfamília como uma linhagem de Epyrinae, e jamais consideram sua proximidade com Mesitiinae. É provável que um novo estudo cladístico que considere para a escolha dos caracteres as últimas mudanças taxonômicas que envolveram Epyrinae e Scleroderminae, assim como os dados moleculares disponíveis, esclareça a posição desses gêneros.

MESITIINAE

Representantes de Mesitiinae nunca foram foco de estudos cladísticos, sendo frequentemente usados como grupo externo de estudo com outros grupos. Um estudo que pretendesse esclarecer as relações internas da subfamília nunca foi realizado. O trabalho mais expressivo envolvendo membros de Mesitiinae foi realizado em por Argaman (2003), no qual sete gêneros foram descritos, com a proposta de divisão em quatro tribos: Domonkosini, Heterocoelini, Mesitini e Triglenusini. Argaman afirmou que os gêneros e tribos propostas por ele seriam monofiléticos, mas, não apresentou qualquer árvore filogenética no artigo.

Nossas análises demonstram que o arranjo das quatro tribos proposto por Argaman (2003) não é recuperado como grupos monofiléticos, sendo essa classificação artificial.

Por outro lado, de forma inédita, nossos dados mostram três linhagens bem definidas: *Heterocoelia*+*Mettrionotus*, *Pseudomesitius*+*Ukayakos*+*Sulcomesitius* e *Pilomesitius*+*Zimankos*+*Itapayos*+*Mesitius*, que não coincidem com o arranjo de Argaman (2003).

Argaman (2003) descreveu Mesitiini baseado nas características compartilhadas pelos gêneros *Anaylax*, *Clytrovorus*, *Incertosulcus*, *Itapayos*, *Mesitius*, *Mettrionotus* e *Parvoculus*. Nossos dados apontam apenas para o agrupamento em uma mesma linhagem *Itapayos* e *Mesitius*.

A tribo Triglenusini foi descrita para acomodar apenas 3 gêneros: *Bradepyrus*, *Triglenus* e *Pseudomesitius*. Destes apenas *Pseudomesitius* foi utilizado em nossa amostragem, e se mostrou mais relacionado com *Sulcomesitius* e *Ukayakos*.

Heterocoelini é composta pelos gêneros: *Botoryan*, *Codorcas*, *Gerbekas*, *Hamusmus*, *Heterocoelia*, *Pynomesitius*, *Sulcomesitius* e *Ukayakos*. Nossos dados apontam para a

existência da linhagem formada por *Heterocoelia*, *Sulcomesitius* e *Ukayakos*. *Sulcomesitius* é recuperado como parafilético, com exemplares agrupando com *Ukayakos* (clado D) e *Heterocoelia* (clado C). A sequência do exemplar classificado como *Ukayakos* é extremamente semelhante às sequências de *Sulcomesitius* do clado D, indicando que os representantes desse clado pertencem ao mesmo táxon.

Argaman (2003) descreveu Domonkosini baseado em características compartilhadas pelos gêneros: *Domonkos*, *Pilomesitius*, *Topcobius* e *Zimankos*. Nossos dados recuperaram o agrupamento *Pilomesitius* e *Zimankos*, mas os exemplares amostrados para esses gêneros apresentam sequências muito próxima ao exemplar de *Itapayos*, da tribo Mesitiini.

Nosso trabalho molecular envolvendo gêneros de Mesitiinae foi realizado simultaneamente a um estudo de reclassificação da subfamília realizado por Barbosa (*in prep*). Os dados preliminares desse trabalho confirmam a organização tribal realizada por Argaman (2003) e demonstram que os gêneros que compõe a subfamília apresentam problemas quanto à suas características diagnósticas e das espécies que os compõe. Indicam, ainda, que os exemplares utilizados em nossas amostras estavam classificados de maneira equivocada e sofrerão mudanças taxonômicas, pois a reclassificação cladística estabelecerá sinonímias entre vários gêneros que serão redefinidos e combinados.

Dessa maneira para o estabelecimento de uma discussão sobre as relações entre os gêneros e as linhagens apontadas pelos nossos dados seria interessante primeiro adequá-los a nova classificação genérica, que foi redefinida baseado em sinapomorfia compartilhadas.

Concluindo, o presente estudo traz uma visão holística da relação interna da subfamília por envolver um grande número de gêneros com representatividade de todas as subfamílias. Foi possível observar uma grande congruência entre a filogenia proposta por dados moleculares com estudos cladísticos propostos com dados morfológicos. Ainda, os dados moleculares revelaram ser uma ferramenta valiosa em um grupo tão diverso e especioso quanto Bethyilidae, que apresenta grupos com dimorfismo sexual acentuado e grupos sujeito a convergência morfológica devido às adaptações ao estilo de vida parasitóide.

É evidente a necessidade de estudos posteriores para o grupo, mas acreditamos que o presente trabalho contribuiu para o direcionamento de várias questões como o esclarecimento posicionamento de alguns gêneros de Scleroderminae e investigação dos gêneros apontados nesse estudo como polifiléticos e parafiléticos.

REFERÊNCIAS

- Alencar IDCC & Azevedo CO (2013) Reclassification of Epyrini (Hymenoptera: Bethylidae): a tribal approach with commentary on their genera. *Systematic Entomology*, 38: 45-80.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1997) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Argaman Q (2003) Generic synopsis of Mesitinae Kieffer, 1914 (Hymenoptera: Bethylidae). *Entomofauna*, 24: 61-96.
- Azevedo CO (2006) Insecta, Hymenoptera, Bethylidae: range extension and filling gaps in Australia. *Check List*, 2: 42-44.
- Azevedo CO (2009) Synopsis of *Lytopsenella* Kieffer (Hymenoptera: Bethylidae). *Zootaxa*, 2286: 58-64.
- Azevedo CO & Azar D (2012) A new fossil subfamily of Bethylidae (Hymenoptera) from the Early Cretaceous Lebanese amber and its phylogenetic position. *Zoologia*, 29: 210-218.
- Belshaw R & Quicke DLJ (1997) A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 81-293.
- Benoit PLG (1982) African Bethylidae. II. Hymenoptera. The genus *Kathepyris* Kieffer New taxa.1. *Revue de Zoologie Africaine*, 96: 185-192.
- Brues C T (1907) Notes and descriptions of North American parasitic Hymenoptera IV. *Bulletin of the Wisconsin Natural History Society*, 5: 96-111.
- Carpenter JM (1999) What do we know about chrysidoid (Hymenoptera) relationships? *Zoologica Scripta*, 28: 215-232.
- Carr M, Young JP & Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics and Evolution*, 41: 55-73.
- Evans HE (1964) A synopsis of the American Bethylidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 132: 1-222.
- Evans HE (1978) The Bethylidae of America North of Mexico. *Memoirs of the American Entomological Institute*, 27: 1-332.

- Finnamore AT & Brothers DJ (1993) Chrysidoidea. *Hymenoptera of the world: An identification guide to families* (ed by Goulet H & Huber JT) Public Works Government Services, Canada, pp.133-136.
- Finnamore AT & Gauld ID (1995) Bethylidae. *The Hymenoptera of Costa Rica* (ed by Hanson P & Gauld ID), *Oxford University Press, Oxford*, pp. 470-479.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 3: 294-297.
- Gobbi FT (2013) Sistemática dos pristocerinae (Hymenoptera, Bethylidae) com parâmeros duplos. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 207p.
- Katoh K, Asimenos G & Toh H (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis Methods in Molecular Biology* (ed by Posada D) Humana Press New York, pp. 537.
- Kieffer JJ (1913) Serphides des Iles Philippines. *Insecta, Revue illustrée d'Entomologie*, 3: 253-462.
- Kieffer JJ (1914) Hymenoptera, Proctotrupoidea, Bethylidae. *Das Tierreich*, 41: 1-595
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Lanes GO & Azevedo CO (2008) Phylogeny and Taxonomy of Sclerodermini (Hymenoptera, Bethylidae, Epyrinae). *Insect Systematics and Evolution*, 39: 55-86.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Mardulyn P & Whitfield JB (1999) Phylogenetic signal in the COI, 16S and 28S genes for inferring relationships among the genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): Evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 282-294.
- Muesebeck CFW (1940) Two new hymenopterous parasites of sugarcane borers in India. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 42: 120-122.

- Pedersen BV (1996) A phylogenetic analysis of cuckoo bumblebees (*Psithyrus*, Lepeletier) and bumblebees (*Bombus*, Latreille) inferred from sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 289-297.
- Ploeg G & Nel A (2004) A new bethylid wasp from the Lowermost Eocene amber of France (Hymenoptera: Bethyridae: Bethylinae). *Geologica Acta*, 2: 75-82.
- Polaszek A & Krombein KV (1994) The genera of Bethylinae (Hymenoptera, Bethyridae). *Journal of Hymenoptera Research*, 3: 91-105.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Sorg M (1988) Zur Phylogenie und Systematik der Bethyridae (Insecta: Hymenoptera: Chrysidoidea). *Sonderveröffentlichungen des Geologischen Institut der Universität zu Köln*, 63: 1-146.
- Stamatakis A, Hoover P & Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology*, 75: 758-771.
- 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 & Evolution*, 28: 2731-2739.
- Terayama M & Yamane S (1998) Four new species of the genus *Pristocera* Klug (Hymenoptera: Bethyridae) from east and southeast Asia. *Entomological Science*, 1: 219-225.
- Terayama M (1995a) Phylogeny and distribution of the subfamily Bethylinae (Hymenoptera: Chrysidoidea: Bethyridae). *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 50:1-10.
- Terayama, M. (1995b) *Caloapenesia* and *Neoapenesia*, new genera of the family Bethyridae (Hymenoptera, Chrysidoidea) from the Oriental Region with proposals two new synonymies of genera. *Japanese Journal Entomology*, 63: 881- 891.
- Terayama M (1996) The phylogeny of the bethylid wasp subfamily Pristocerinae (Hymenoptera: Bethyridae). *Japanese Journal of Entomology*, 64: 587-601.
- Terayama M (2003a) Phylogenetic systematics of the family Bethyridae (Insecta: Hymenoptera) Part I. Higher classification. *The Academic Reports of the Faculty of Engineering of Tokyo Polytechnic University*, 26: 1-15.

- Terayama M (2003b) Phylogenetic systematic of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera). Part II. Keys to subfamilies, tribes and genera in the world. Academic Reports. *The Academic Reports of the Faculty of Engineering of Tokyo Polytechnic University*, 26 1: 16-29.
- Terayama M (2004) *Formosiepyris*, a new genus of the family Bethylidae (Hymenoptera, Chrysidoidea) from the Oriental region, with a proposal of a new synonymy of genus. *Liberal Arts*, 12: 91-99.
- Várkonyi G & Polaszek A (2007) Rediscovery and revision of *Foenobethylus* Kieffer, 1913 (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 1546: 1-14.
- Waichert C & Azevedo CO (2009) Phylogenetic analysis of *Rhabdepyris* (Hymenoptera, Bethylidae) and redefinition of generic limits based on morphological characters. *Zootaxa*, 2284: 1-29.
- Westwood JO (1832) Descriptions of several new British forms amongst the parasitic hymenopterous insects. *London and Edinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1: 127-129.
- Xia X & Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.
- 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.
- Zamprogno LN & Azevedo CO (*in press*) Phylogeny and reclassification of *Pristocera* Klug (Hymenoptera: Bethylidae). *Insect Systematics and Evolution*.