

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

**Uso de marcadores moleculares na taxonomia de
Dissomphalus (Hymenoptera, Bethyridae) e gêneros
relacionados**

Arturo Benincá Martinelli

Vitória, ES
Janeiro, 2013

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

**Uso de marcadores moleculares na taxonomia de
Dissomphalus (Hymenoptera, Bethyridae) e gêneros
relacionados**

Arturo Benincá Martinelli

Orientador: Celso Oliveira Azevedo

Coorientadora: Valéria Fagundes

**Dissertação 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 Mestre em Biologia
Animal**

**Vitória, ES
Janeiro, 2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M385u Martinelli, Arturo Benincá, 1988-
Uso de marcadores moleculares na taxonomia de
Dissomphalus (Hymenoptera, Bethylidae) e gêneros
relacionados / Arturo Benincá Martinelli. – 2013.
87 f. : il.

Orientador: Celso Oliveira Azevedo.
Coorientadora: Valéria Fagundes.
Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Evolução (Biologia). 2. Genética. 3. Zoologia. 3.
Himenóptero. I. Azevedo, Celso Oliveira. II. Fagundes, Valéria.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Uso de marcadores moleculares na taxonomia de *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethyridae) e gêneros correlatos”

AUTOR: ARTURO BENINCÁ MARTINELLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. CELSO OLIVEIRA AZEVEDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:



Dr. CELSO OLIVEIRA AZEVEDO
Orientador



Dra. LEONORA PIRES COSTA
Membro Interno



Dr. EDUARDO ANDRADE BOTELHO DE ALMEIDA
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 25 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Eu dedico este trabalho aos meus dois orientadores Celso Oliveira Azevedo e Valéria Fagundes. Agradeço a paciência de me ensinar a ser um cientista durante esses anos de orientação; pelo apoio incondicional que me permitiu desenvolver e escrever esse trabalho; pela oportunidade de ser orientado; pelos incentivos, “puxões de orelha” e conhecimentos compartilhados que me proporcionaram o desenvolvimento do meu saber e caráter científico,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo financiamento do projeto, bolsa de mestrado e amparo.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal (LGA) e Instituto Bethylidae de Sistemática (IBES), em especial a Daniele Mugrabi, pelos momentos enérgicos de descontração, a ajuda imprescindível na ajuda da identificação das amostras e ainda a boa vontade de me ajudar no que foi preciso.

Aos meus pais Tarcisio e Penha por serem meu porto seguro, sempre fornecendo todo amor, carinho e proteção que preciso; pelos genes que me passaram e o meio que vivo, ambos fizeram de mim o que sou; por toda sabedoria e caráter que será passado sempre adiante; por terem me aguentado nesse período de de mestrado assim como nas várias noites sem dormir quando eu era criança.

A minha irmã e querida Mendy, por ser recíproco o verdadeiro amor fraterno, dividindo as alegrias e tristezas, e por ser uma pessoa indispensável para eu me senta bem,

Aos amigos que nem preciso citar, eles já sabem do meu profundo respeito e admiração, basta lembrar dos momentos das risadas alegres; dos filmes bons e os frustrantes; dos Animes vistos; do RPG jogado; das viagens inesquecíveis; dos sushis e coisas boas da vida,

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	01
Lista de figuras.....	02
Resumo	05
Abstract	06
Apresentação.....	07
Referências	09
Capítulo 1 - Digestão com Proteinase K para acessar a morfologia da genitália..	11
1.1. <i>Introduction</i>	12
1.2. <i>Materials and Methods</i>	13
1.2.1. <i>Taxa sampling and experiment design</i>	13
1.2.2. <i>Genitalia preparation procedure</i>	13
1.2.3. <i>Genitalia analysis</i>	14
1.2.4. <i>DNA extraction and in vitro amplification of COI gene</i>	14
1.3. <i>Results and Discussion</i>	15
1.3.1. <i>Size matters to KOH procedure</i>	15
1.3.2. <i>Cost-benefice discuss: PK versus KOH procedure</i>	16
1.3.3. <i>DNA matter: quality, quantity, problems and solutions</i>	18
1.4. <i>Conclusion</i>	20
1.5. <i>Acknowledgements</i>	21
1.6. <i>References</i>	21
1.7. <i>Figures</i>	26
Capítulo 2 - Marcadores moleculares na associação macho-fêmea de espécimes de <i>Dissomphalus</i> (Hymenoptera, Bethylidae) da Tailândia	29
2.1. <i>Introdução</i>	29
2.2. <i>Materiais e Métodos</i>	31
2.2.1. <i>Material biológico</i>	31
2.2.2. <i>Extração e amplificação de DNA</i>	31
2.2.3. <i>Purificação e sequenciamento de DNA</i>	32
2.2.4. <i>Análises dos dados</i>	33
2.2.5. <i>Associação macho-fêmea</i>	34
2.3. <i>Resultados</i>	34

2.4. Discussão.....	37
2.4.1. Variações de tamanho do ITS2.....	37
2.4.2. Associação sexual.....	39
2.5. Referências	43
2.6. Tabelas e figuras	48
Capítulo 3 - Testando o monofiletismo de <i>Dissomphalus</i>, <i>Trichiscus</i> e <i>Protisobrachium</i> (Hymenoptera, Bethyridae) usando marcadores moleculares.....	54
3.1. Introdução	54
3.2. Materiais e Métodos	56
3.2.1. Material biológico	56
3.2.2. Extração e amplificação de DNA	56
3.2.3. Purificação e sequenciamento de DNA	57
3.2.4. Inferências filogenéticas	58
3.3. Resultados.....	59
3.3.1. Amostragem	59
3.3.2. Matrizes de dados	60
3.3.3. Inferências filogenéticas	61
3.4. Discussão.....	62
3.4.1. Monofiletismo de <i>Dissomphalus</i> , <i>Trichiscus</i> e <i>Protisobrachium</i>	62
3.4.2. <i>Dissomphalus</i> e <i>Protisobrachium</i> : gêneros polifiléticos?	67
3.4.3. <i>Trichiscus</i> e <i>Protisobrachium</i> devem ser tratados como sinônimos de <i>Dissomphalus</i> ?	68
2.5. Referências	72
2.6. Tabelas e figuras	75
4.0 Apêndice - Ilustrações de Exemplares	81

Lista de tabelas

Tabela 1: Relação dos exemplares em que pelo menos um dos marcadores foi sequênciado

Tabela 2: Estimativa de divergência evolutiva par-a-par entre sequências de 28S de *Dissomphalus* da Tailândia expressas em porcentagem.

Tabela 3: Estimativa de divergência evolutiva par-a-par entre sequências de COI de *Dissomphalus* da Tailândia expressas em porcentagem.

Tabela 4: Relação dos exemplares em que pelo menos um dos marcadores foi sequênciado.

Lista de figuras

Figura 1: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal antes do tratamento com KOH

Figura 2: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão lateral antes do tratamento com KOH

Figura 3: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão ventral antes do tratamento com KOH

Figura 4: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal depois do tratamento com KOH

Figura 5: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão lateral depois do tratamento com KOH

Figura 6: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal depois do tratamento com KOH

Figura 7: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal antes do tratamento com Proteinase K

Figura 8: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão lateral antes do tratamento com Proteinase K

Figura 9: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão ventral antes do tratamento com Proteinase K

Figura 10: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal depois do tratamento com Proteinase K

Figura 11: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão lateral depois do tratamento com Proteinase K

Figura 12: Genitália masculina de *Dissomphalus* sp. em visão dorsal depois do tratamento com Proteinase K

Figura 13: Genitália masculina de *Kathepyris* sp. em visão dorsal antes do tratamento com KOH

Figura 14: Genitália masculina de *Kathepyris* sp. em visão lateral antes do tratamento com KOH

Figura 15: Genitália masculina de *Kathepyris* sp. em visão ventral antes do tratamento com KOH

Figura 16: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão dorsal depois do tratamento com KOH

Figura 17: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão lateral depois do tratamento com KOH

Figura 18: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão dorsal depois do tratamento com KOH

Figura 19: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão dorsal antes do tratamento com Proteinase K

Figura 20: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão lateral antes do tratamento com Proteinase K

Figura 21: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão ventral antes do tratamento com Proteinase K

Figura 22: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão dorsal depois do tratamento com Proteinase K

Figura 23: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão lateral depois do tratamento com Proteinase K

Figura 24: Genitália masculina de *Kathepyris sp.* em visão dorsal depois do tratamento com Proteinase K

Figura 25: Habitus de *Dissomphalus sp.* após dissecção da genitália

Figura 26: Habitus de *Kathepyris sp.* após dissecção da genitália

Figura 27: Padrões de alinhamento de ITS2 em *Dissomphalus*. A) Aproximadamente os 100 primeiros pares de base de ITS2 homólogos ao 5.8S de outros Hymenoptera e bastante conservado em *Disomphalus*. B) Bloco de *indels* comparável apenas no grupo de espécie formado pela fêmea e *D. verus*. C) Mesmo padrão de *indels* compartilhados entre a fêmea e *D. verus* (seta amarela). D) Blocos de homologia entre as sequências intercalados com *indels*.

Figura 28: Inferências filogenéticas bayesianas de COI (esquerda) e 28S (direita) dos *Dissomphalus* da Tailândia. Os números próximos aos nós se referem a probabilidade posterior. Destaca-se no quadrado verde o posicionamento da fêmea pertencendo ao mesmo grupo monofilético que *D. verus*.

Figura 29: Fêmea de *Dissomphalus verus*, cabeça em vista dorsal

Figura 30: Fêmea de *Dissomphalus verus*, cabeça em vista frontal

Figura 31: Fêmea de *Dissomphalus verus*, mesossoma em vista dorsal

Figura 32: Fêmea de *Dissomphalus veru*, mesossoma em vista lateral

Figura 33: Metassomo em vista dorsal revelando o processo tergal (setas brancas), quando presente. A, *Dissomphalus verus* com processo tergal no segundo tergito. B, *Protisobrachium* sp. sem processo. C, *Trichiscus* sp. com processo tergal no terceiro tergito. D, Genêro Indeterminado com processo tergal no terceiro tergito.

Figura 34: Inferência filogenética bayesiana de 28S de *Pristocerinae*. Os números próximos dos nós representam probabilidade posterior. As cores são referentes a região zoogeográfica conforme indicada no canto superior direito da figura.

Figura 35: Inferência filogenética bayesiana de COI de *Pristocerinae*. Os números próximos dos nós representam probabilidade posterior. As cores são referentes a região zoogeográfica conforme indicada no canto superior direito da figura.

Figura 36: *Dissomphalus* sp. coletado em cópula forética. Macho alado e a fêmea áptera. (Retirado de www.waspweb.org)

Figura 37: Habitus de *Trichiscus* sp. (A), *Protisobrachium* (B) e Genêro Indeterminado (C).

Resumo

Dissomphalus Ashmead 1893 (Hymenoptera, Bethyilidae) é um gênero de Pristocerinae considerado cosmopolita. *Dissomphalus* pode ser diagnosticado a partir de caracteres de machos, em especial devido a presença de dois tubérculos pubescentes localizados no tergito II do metassomo, chamado de processo tergal. No entanto, foi sugerido que a característica da genitália masculina de *Dissomphalus* “edeago dividido em corpo dorsal e ramo ventral” seja considerada a delimitação do gênero em detrimento do processo tergal. Se por um lado a diagnose de *Dissomphalus* parece ser discutida bem, por outro há uma série de problemas a serem superados, como a obrigatoriedade de se acessar caracteres da genitália masculina para identificação acurada do gênero, a dificuldade de se realizar a associação macho-fêmea de *Dissomphalus* e a existência de características apontadas como sinapomorfias do grupo na ausência de estudos filogenéticos. Atualmente, marcadores moleculares associados a dados morfológicos tem subsidiado a associação de espécimes machos e fêmeas de forma espécie-específica e a inferência de filogenias. Assim, o presente estudo se baseou na análise de três marcadores moleculares (COI, 28S e ITS2) para subsidiar avanços teóricos na taxonomia de *Dissomphalus* e gêneros relacionados como *Trichiscus* Benoit 1957 e *Protisobrachium* Benoit 1957. Primeiramente, comparou-se a utilização da enzima proteolítica Proteinase K em contraste com os métodos tradicionais de preparação da genitália o que permitiu a constatação de que é possível acessar a estrutura da genitália masculina concomitantemente à obtenção de DNA adequado para estudos moleculares. Foi possível associar de forma espécie-específica o único espécime fêmea de *Dissomphalus* coletado na Tailândia com a espécie *D. verus* Mugrabi & Azevedo descrita recentemente. Além disso, foi demonstrado que *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium*, gêneros que apresentam a característica “edeago dividido em corpo dorsal e ramo ventral”, compartilham um ancestral comum único e exclusivo. A partir dessa constatação, foi discutido se esses três gêneros relacionados seriam sinônimos juniores de *Dissomphalus*. Verificou-se que seria mais prudente a manutenção dos gêneros *Trichiscus*, *Dissomphalus* e *Protisobrachium* e o abandono da definição de *Dissomphalus* como o gênero que apresenta o “edeago dividido em corpo dorsal e ramo ventral” até que seja elucidada se o processo tergal surgiu uma única vez.

Abstract

Dissomphalus Ashmead 1893 (Hymenoptera, Bethyridae) is a genus of Pristocerinae considered cosmopolitan. *Dissomphalus* can be classified for his male characteristics, specially due to the presence of two pubescent tuberculous localized in tergite II of the metasoma, also known as tergal process. However, it's been suggested the male genitalia characteristic of the *Dissomphalus* "aedeagus divided in dorsal body and ventral ramus" to be considered the delimitation of gender in detriment of the tergal process. If the diagnose of *Dissomphalus* seems well discussed, on the other hand there are several problems to overcome, such as the obligation of accessing male genitalia characteristics for accurate identification of the gender, or the difficulty of accomplishing the association male-female of *Dissomphalus* and the existence of characteristics pointed as synapomorphy of the group in the absence of phylogenetic studies. Nowadays, molecular marker associated to morphologic data have auxiliated the association of male and female specimens in the form of specimens-specific and the inference of phylogeny. In this manner, the present study has been based in the analysis of three molecular markers (COI, 28S e ITS2) to auxiliary theoretical advances in the taxonomy of *Dissomphalus* and related genders as *Trichiscus* Benoit 1957 and *Protisobrachium* Benoit 1957. First of all, the utilization of the proteolytic enzyme Proteinase K contrasting the traditional methods of preparation of the genitalia, which allowed the constatation that it is possible to access the structure of male genitalia at the same time it is possible to access the adequate DNA acquisition for molecular studies. It's been possible to associate in the form specimens-specific (creio que seja um termo específico, certo? não sei se é a melhor tradução) the only female specimen of *Dissomphalus* collected in Thailand with the specimen *D. verus* Mugrabi & Azevedo described recently. In addition, it's been demonstrated that *Dissomphalus*, *Trichiscus* and *Protisobrachium*, genders who present the characteristic "aedeago divided in dorsal body and ventral ramus" share a common, unique and exclusive ancestor. From that assessment, it's been discussed if these three related genders would be junior synonyms of *Dissomphalus*. It's been verified it would be more prudent to keep the genders *Trichiscus*, *Dissomphalus* and *Protisobrachium* and to abandon the definition of *Dissomphalus* as the gender which presents the "aedeago divided in dorsal body and ventral ramus" until is elucidated if the tergal process appeared was arisen only once.

Apresentação

Bethylidae (Hymenoptera; Chrysidoidea) compreendem um grupo de vespas de uso potencial em programas de controle biológico de populações de coleópteros e lepidópteros devido ao hábito de vida parasitoide (Berry 1998, Perez-Lachaud et al. 2004, Batchelor et al. 2006). Dentre os gêneros de Bethylidae, *Dissomphalus* Ashmead 1893 (subfamília Pristocerinae) é considerado o mais abundante da região Neotropical, tanto em número de espécies quanto de indivíduos (Azevedo 2003). Atualmente, 243 espécies são válidas, sendo 84% restritas à região Neotropical (Mugrabi 2011).

O gênero *Dissomphalus* foi delimitado enfatizando-se os caracteres morfoestruturais de machos (Ashmead 1893), em especial, a presença de dois tubérculos pubescentes localizados no tergito II do metassoma que é o caráter diagnóstico do gênero (Ashmead 1893), chamado de processo tergal (Azevedo 1999). Mais tarde, por *Dissomphalus* se caracterizar como um gênero muito especioso, Evans (1954, 1962) propôs uma organização das espécies em três grupos de espécie baseados na distância e tamanho dos dois tubérculos. No entanto, essa proposta de Evans não foi seguida por autores posteriores.

Azevedo (1999, 2000, 2001 e 2003) propôs a organização das espécies de *Dissomphalus* em 25 grupos de espécie reconhecendo a importância maior da genitália masculina em relação ao processo tergal para a delimitação dos grupos. A justificativa para tal decisão é de que alguns exemplares apresentavam padrões distintos de genitália mesmo compartilhando um processo tergal similar, ou até o oposto, na qual um mesmo padrão de genitália era compartilhado entre espécimes com processos tergal distintos ou até ausentes (Azevedo 1999). Assim, a aplicabilidade do processo tergal na delimitação de grupos de espécie foi questionada e a importância da genitália na taxonomia do grupo foi reconhecida.

De modo geral, com o avanço no conhecimento taxonômico de Bethylidae, a genitália masculina tem sido uma fonte fundamental de caracteres para o delineamento taxonômico do grupo (Azevedo 2003). Assim, por um lado, alguns autores defendem o uso do processo tergal como o principal caráter sinapomórfico de *Dissomphalus* (Terayama 1996), desconsiderando as características da genitália, enquanto que outros apontam que os caracteres genitais são mais informativos para o gênero do que os do processo tergal mesmo que filogenias não tenham sido inferidas (Azevedo 1999, 2000, 2001 e 2003). Apesar disso, atualmente pode-se dizer que *Dissomphalus* difere dos

demais Bethylidae por possuir o edeago dividido em duas lâminas, independente de ter ou não o processo tergal (Azevedo 2003).

Se por um lado a diagnose do gênero está bem definida, por outro há uma série de problemas a serem superados, como a obrigatoriedade de se acessar caracteres da genitália para identificação acurada do grupo, a dependência de análise de caracteres provenientes exclusivamente de machos com ausência de uma abordagem que permita a associação de fêmeas e finalmente a falta de uma análise filogenética sinalizando-se caracteres da genitália para definição da sinapomorfia do gênero.

Estudos mais modernos para esclarecer hipóteses filogenéticas e associar espécimes machos e fêmeas de forma espécie-específica têm utilizado marcadores moleculares associados aos dados morfológicos (Zaldivar-Riveróna et al. 2008, Carr *et al.* 2010, Pilgrim & Pitts 2006). Essa metodologia além de eficaz, permite acessar material preservado em coleções antigas, e uma vez padronizada, pode ser utilizada para comparar do ponto de vista filogenético machos, fêmeas e até grupos próximos, mesmo que existam dúvidas a respeito da homologia entre os caracteres morfológicos, desde que utilizados porções de DNA homólogas e comparáveis.

Assim, considerando o sucesso do uso de marcadores moleculares para a sistemática e filogenética em outros trabalhos de Hymenoptera, o presente estudo se baseou em análises de três marcadores moleculares para subsidiar avanços teóricos na taxonomia de *Dissomphalus* e táxons relacionados.

No primeiro capítulo, foi apresentada uma abordagem metodológica que permite acessar a estrutura da genitália masculina e concomitantemente gerar amostras de DNA adequadas para estudo molecular. Discutem-se os métodos tradicionais de limpeza, preparação, montagem e armazenamento da genitália com um método que utiliza enzimas proteolíticas, destacando-se vantagens e desvantagens de cada método.

No segundo capítulo é discutida uma metodologia para se associar fêmeas e machos de *Dissomphalus*, destacando-se as limitações e imprecisões do método molecular. Considerando-se que exemplares de *Dissomphalus* em cópula são raros em coleções ou atividades de campo, e o dimorfismo sexual é alto, essa metodologia se mostra bastante promissora.

No terceiro capítulo é discutido pela primeira vez na literatura o arranjo filogenético molecular de *Dissomphalus* e gêneros correlatos, com abordagens sobre o monofiletismo do gênero e o uso dos caracteres da genitália masculina e do processo tergal como sinapomorfias de *Dissomphalus*. No apêndice há ilustrações dos gêneros.

Referências

- Ashmead WH (1893) A monograph of the North American Proctotrypidae. *Bulletin of the United States National Museum*, 45:1-463.
- Azevedo CO (1999) On Nearctic *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae), with the description of two new species from Florida. *Iheringia*, 87:49-56.
- Azevedo CO (2003) Synopsis of the Neotropical *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 338:1-74.
- Azevedo CO (2001) Systematics of the Neotropical *Dissomphalus* Ashmead (Hymenoptera, Bethylidae) of the bicavatus group. *Revista Brasileira de Entomologia*, 45:173-205.
- Azevedo CO (2000) The dumosus group of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae): definition and description of a new amazonian species. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 16:91-97.
- Batchelor, TP, Hardy ICW, Barrera JF (2006) Interactions among bethylid parasitoid species attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Biological Control*, 36:106–118.
- Berry JA (1998) The bethyline species (Hymenoptera, Bethylidae, Bethylinae) imported into New Zealand for biological control of pest leafrollers. *New Zealand Journal of Zoology*, 25: 329–333.
- Carr JW, Young M, Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics & Evolution*, 41:55–73.
- Evans HE (1962) Further studies on the genus *Dissomphalus* in the United states, Mexico and the Greater Antiles (Hymenoptera: Bethylidae) *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 64:65-79.
- Evans HE (1954) The North American species of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 56:288-309.
- Mugrabi DF. *Dissomphalus* da Tailândia, 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.
- Perez-Lachaud G, Batchelor TP, Hardy ICW (2004) Wasp eat wasp: facultative hyperparasitism and intra-guild predation by bethylid wasps. *Biological Control*, 30:149–155.

- Pilgrim EM, Pitts JP (2006) A molecular method for associating the dimorphic sexes of velvet ants (Hymenoptera: Mutillidae). *Journal of The Kansas Entomological Society*, 79:222–230.
- Terayama M (1996) Phylogeny of the bethylid wasp subfamily Pristocerinae (Hymenoptera, Bethyridae). *Japanese Journal of Systematic Entomology*, 64:587-601.
- Zaldivar-Riveróna A, Belokobylskij AS, León-Regagnona V, Briceño R, Quicke DL. (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan parasitic wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Invertebrate Systematics*, 22:345–363.

CAPÍTULO 1

Digestão com Proteinase K para acessar a morfologia da genitália

(Proteinase K digestion to access genitalia morphology: killing two birds with one stone)

A ser submetido à revista Zootaxa, classificação Qualis B1, fator de impacto 0,927.

Abstract

Insect genitalia, traditionally, are accessed after dissection and cleaning with strong chemical base solution such potassium hydroxide (KOH). One potential problem is the damage of genitalia during the cleaning procedure. In addition, the DNA eliminated from the soft tissue by the KOH is unreclaimed that cannot be used for analyses. The development of a technique that allow the DNA extraction that preserve the genitalia for morphological analyses, can be used as a powerful argument to convince curators to access holotypes and rare specimens of collections. Anyhow, structures like genitalia need to be removed for an accurate identification of reassessed specimens. Herein, we compare qualitatively the use of KOH and a enzymatic procedure via Proteinase K (PK) to access genitalia structure using Bethyridae (Hymenoptera, Chrysidoidea) specimens as model, discuss some practices to get workable DNA from insects and conclude that PK procedure showed to be alternative method with better cost-benefice than KOH to obtain good DNA and because the genitalia are better cleaned for morphological studies, even if PK is more expensive.

Key words: Insecta, Bleaching, Diaphanization, DNA extraction, KOH, genitalia preparation, museum curation, holotypes.

1.1. Introduction

Searching for new sources of characters is essential to improve the knowledge about species and its adequate description (Gibson 1993). In a recent past, most descriptions were restricted to external morphological characters. This scenario has been changing and more and more internal morphology and DNA sequence has been used as new sources of information for species diagnosis and description. Indeed, the new challenge is to reevaluate vouchers and types deposited in entomological collections description under these new approaches (Quicke *et al.* 1999).

The insect genitalia structures are basically analyzed after dissection and cleaning with a strong chemical base solution like potassium hydroxide (KOH) (Gurney *et al.* 1964). The purpose of this procedure is hasten the decomposition of soft tissues as well as some poorly sclerotized genital structures and clarify the genitalia (diaphanization) allowing the drawing of structures using camera lucida and the photographing in high resolution cameras. One potential problem is the progressive damage of important structures during a more abrasive cleaning procedure, imputing thus, constraints for taxonomic studies. In addition, DNA eliminated from the soft tissue by the KOH is unreclaimed and cannot be used for subsequent analyses due DNA degradation.

The development of a technique that allow the DNA extraction with compromise the preparation of the genitalia for morphological analyses, preserving all structures, can be used as a powerful argument to convince curators to access holotypes and some rare specimens of antique collections (Knölke *et al.* 2005). Anyhow, structures like genitalia need to be removed for an accurate identification of reassessed specimens, mainly from the old vouchers and types investigated in the past.

Under this perspective, Knölke *et al.* (2005) used Proteinase K, a routine enzyme in molecular biology laboratories, in order to obtain DNA and potentially preserve morphological traits in Lepidoptera. The protocol was based on the use an enzyme that lyses all proteins from soft tissues, liberating the DNA for subsequent extraction from the residue solution after digestion. Later, Hundsdoerfer & Kitching (2010) showed that is feasible to extract and sequence DNA from some ancient specimens with minimal damage of external and internal abdominal characters in large Lepidoptera specimens. On the other hand, the efficacy of cleaning, diaphanization and structure preservation of genitalia using Proteinase K in contrast to KOH treatment was not evaluated yet.

Herein, we compare qualitatively the use of KOH and Proteinase K to access genitalia structure for morphology studies using Bethyridae (Hymenoptera, Chrysidoidea) specimens as model, discuss some practices to get workable DNA from insects and reiterate a protocol to prepare genitalia that preserves DNA.

1.2. Materials and Methods

1.2.1. Taxon sampling and experiment design

We used male specimens of Bethyridae with differences on size and morphology of genitalia: *Dissomphalus* Ashmead specimens (3,4 mm), with small genitalia (0,52 mm) and small amount of musculature after genitalia dissection (Figures 1-3 and 7-9) and *Kathepyris* Kieffer specimens (5,8mm) with large genitalia (1,3 mm), a great amount of musculature and with poorly sclerotized membranes (Figures 13-15 and 19-21).

The last metasomal segment which has the genitalia were withdrawn by dissection with a sterile needle and storage in polyethylene genitalia vials in glycerin.

1.2.2. Genitalia preparation procedure

The genitalia were digested either with hydroxide potassium (KOH) or Proteinase K (PK) in order to evaluate the effectiveness of cleaning and bleaching of the structure for morphological analysis. The same conditions of time and concentration of each solution was used in order to standardize the procedure and power of digestion and then make easy the comparative analysis.

For KOH digestion, the last segment of metasoma was submersed in a 10% KOH solution using a sterile needle and kept submerge in the solution at high temperature until all of the soft tissue was digested. Then, the segment was washed in acetic acid 25% to neutralize the pH and the genitalia, terga and sterna were separated from each other by dissection and washed with water for cleaning the structure. All structures were put into a polyethylene genitalia vial with glycerin.

For PK digestion, the last segment of metasoma was placed into a 1,5 mL microcentrifuge tube containing a solution of 5 uL of Proteinase K (20 mg/ml) and 25 uL of buffer (pH 8.0, 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl; 0.5% SDS) using a sterile needle and kept overnight (at least 8 hours) at 55°C in a hot plate or incubator.

Then, the solution was pipetted taking care to not pull the genitalia into the pipette and transferred to a new tube for DNA extraction. Another way was to withdraw the genitalia using a sterile needle and the remaining solution (containing tissue debris) was stored for DNA extraction procedure. For enzyme inactivation from genitalia, it was kept at 95°C for 10 minutes.

1.2.3. Genitalia analysis

The genitalia were photographed at ventral, dorsal and lateral views using the EntoVision® system combined with Helicon Focus®. Final images in the plates were manipulated in Adobe Photoshop®. The cleaning, diaphanization and structure preservation of the genitalia after digestion treatments were visually analyzed and discussed.

1.2.4. DNA extraction and in vitro amplification of cytochrome oxidase I (COI) gene

The DNA was extracted using the 30 ml solution after Proteinase K digestion and the DNA MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Tissue kit following the manufacturer's protocol, with final suspension volume of up to 30 µL instead of 200 µL, as recommended.

The 650-base pair fragment of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene was amplified using the standard barcoding primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.* 1994). The Polymerase Chain Reaction (PCR) reactions were performed using an ABI Veriti® Thermal Cycler. We used 50 µL final volumes of PCR including 1-4 µL of DNA extract, 1x Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP mix, 0.16 µM of each primers and 1.0U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Inc.). Initial denaturation was performed at 93°C for 5 min, followed by 35 cycles of 93°C for 1 min, 46°C for 45 sec and 72°C for 45 sec, with a final extension at 72°C for 5 min. In order to improve the success of PCR amplifications, either an additional PCR reaction was performed using as template 0.5 µL of the first PCR product or increasing the cycles of first PCR from 35 to 45. To check the presence of COI fragment, the 3 µL of PCR product was run on a 1% TBE agarose gel. From positive reactions, the PCR products were purified using an enzymatic purification procedure with ExoSAP-IT® kit (USB Corporation) and sequenced on both directions following the Big Dye® Terminator

protocol (Applied Biosystems) on an ABI3700 Genetic Analyser. To confirm the generated sequence identity, the BLAST tool was used (Altschul *et al.* 1997)

1.3. Results and Discussion

Both KOH and PK digestions successfully promoted the genitalia cleaning for morphological analyses. Although we observed distinctive results for each cleaning procedure in large specimens, they allowed accessing the relevant genitalia features to taxonomy and systematic analyses.

1.3.1. Size matters to KOH procedure

Especially for large specimens, the PK procedure showed to be indubitably more appropriated to reveal and preserve details of genitalia morphology, such as sclerites, membranes and hairs without damage (Figures 22-24 and 16-18). On the other hand, none differences were observed between PK and KOH procedure for small individuals.

For large animals, a longer exposure of KOH was needed for cleaning all soft tissues of genitalia, which resulted in a higher degradation of sclerites structures, shortening of the apex of hairs and disappearing of the sclerotized membranes (Figures 16-18).

In order to avoid damages of genitalia structure by KOH, we tested the reduction of the time of incubation. In this case, we observed partial musculature digestion without sclerite degradation; however, it was difficult to visualize the genitalia structures. We also used more time to incubation, but the genitalia showed either early stages of degradation of some parts with debris of soft tissues, suggesting that change the KOH exposure time alone was not enough to reduce the KOH degradation in the analyzed large specimens.

On the contrary of KOH procedure, the PK cleaning by enzyme degradation the target are exclusively soft tissues, keeping intact the structures of the large genitalia, including the poor sclerotized structures such as membranes (Figs. 22-24). The genitalia structures remained rigid and preserved, making easy to identify also different texture patterns.

In order to observe if longer exposure of PK procedure causes some damage to genitalia, we made a test putting the already cleaned genitalia in a higher concentration

of PK solution (over 60ng/uL) for more than 72 hours, renewing PK solution each day. We observed that even in these conditions, the genitalia maintained preserved, with no clarification or damage even on thin hairs or membranes.

For small individuals, no obvious differences between KOH and PK treatment for genitalia preparation was observed, probably due to the less amount of soft tissues with the coincidentally fact that the classic procedure conditions has been ideal for small genitalia (Figs. 4-6 and 8-10).

Analyzing the differences between KOH cleaning procedure for large and small genitalia tested, we rectified that a standardization of the time of exposure and concentration of KOH is the most challenging task to achieve genitalia cleaning and preservation under satisfactory conditions. Gurney *et al.* (1964) showed this preoccupation when discuss the use of sodium hydroxide as an alternative to reduce the degradation of specimens when KOH procedure is being standardized. However, the problem is the use of corrosive chemical agent to prepare the genitalia and the fact that size and taxa matter in the standardization.

The main concern, in this case, is the loss of specimens by trial and error that occurs constantly to standardize the KOH procedure. This represents a constraint if the sample is composed by type specimens, or even a few number of common specimens. As alternative, PK procedure shows to be a better choice because size does not matter and the specimen is not lost during a PK standardization procedure.

1.3.2. Cost-benefit discussion: PK versus KOH procedure

The PK procedure, generally, has higher cost-benefit than KOH.

First, it is feasible to access genitalia morphology without damaging the structure. The preservation of structures is the most important and required feature for taxonomy and systematic studies. For example, Nihei & Carvalho (2007) showed that male genitalia is strongly informative for Muscini (Diptera, Muscidae) taxonomy, but some encoded genitalia character is located in a poorly sclerotized membrane that could be hardly observed if KOH procedure was not properly applied. Another potential problem to KOH procedure was registered by Rognes (2009) that described the abdomen of a holotype and reported that large black spots observed in pinned animals disappeared after boiling in KOH, changing the holotype characters. These kinds of problems are avoidable using the PK procedure.

Second, it is possible to obtain high quality DNA from PK procedure in contrast to KOH, since the residue of degradation is completely discarded and not saved. Overall, the DNA extraction from small specimens has been a hard work for biologists, especially from voucher or type specimens from zoological collections.

Herein, we faced an opportunity to combine DNA extraction and vouchering, since the PK procedure allow obtained DNA preserving sclerotized structure. Rowley *et al.* (2007) had proposed to immerse the whole body of voucher specimen into extraction buffer to obtain DNA. They compare terrestrial arthropod taxa with different morphological features, such as size, color and sclerotization, and concluded that, in general, post-cleaning carcasses, the remainder voucher, were distinguishable and adequate to morphological studies purpose, even if some damage with slight discoloration or slight-to-moderate distortion of surface features were observed.

We tried to use the whole body of Bethyridae individuals as a source of DNA using a commercial kit (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Tissue kit) or a traditional Tris-NaCl protocol (Bruford *et al.* 1992), and removed the specimen after PK lyses step. Unfortunately, in all cases, the post-cleaning specimens became disjointed when pinned and this caused alterations in exoskeleton integrity, especially in sclerite joints, probably due to the lost of all musculature in an empty exoskeleton. It is noteworthy that we used Tris-NaCl extraction buffer instead of GuSCN as adopted by Rowley *et al.* (2007), a cheaper solution with good results to obtain DNA and preserve non digested structures (Rohland *et al.* 2004; Rohland & Hofreiter 2007).

In order to avoid the loss of individuals, we also tested to used single legs to obtain DNA by PK treatment, as previously used by some authors (Starks & Peters 2002; Lodge & Freeland 2003; Watts *et al.* 2007). Our observation suggest a single leg is enough to obtain a good DNA quantity in large exemplars, but seem to be worthless due to the voucher mutilation, once these specimens, in general, had the genitalia already removed for species identification. Thus, PK procedure is a alternative to extract DNA without damage vouchers and new exemplars more than necessary to identify then accurately by morphological characters.

A non neglected aspect, however, is that PK method is costly. Enzyme usually is more expensive than common chemical bases, such KOH, and the procedure require other reagents to buffer solution preparation, such as Tris, EDTA, NaCl and SDS. In fact, PK is an enzyme that requires some specific conditions already known to digest tissue (Hilz *et al.* 1975; Bajorath *et al.* 1988). Therefore, there is no need to use all these

substances if the purpose is only to clean genitalia reducing costs. It is possible to find in PK manufactures protocol information about PK activity. Only with Tris-Cl (pH 8) at 55°C is needed for some enzyme activity that certainly is sufficient to clean soft tissue despite more time will needed to digest if compared with the buffer with more activity PK factors. It is also noteworthy that PK and their associated reagents are routine substances in any molecular biology laboratory, used regularly for DNA extraction and electrophoresis (Maniatis *et al.* 1989).

KOH procedure, on the other hand, promotes diaphanization (bleaching) and clean the genitalia (Fig. 4-6 and 14-16), while PK procedure only clean (Fig. 10-12 and 22-24), even with extended exposure times in PK solution (more than 72h). Diaphanization, sometimes called bleaching, is a necessary method to observe some internal structures or enhance nuances of characters when pigments hinder then (Trpis 1970; Stüben & Linsenmair 2009). However, mostly chemical bleaching, like hydrogen peroxide, hydroxide sodium and others degrade DNA. Herein we assume the premise that DNA should be preserved and it is for this reason that we encourage a combination approach when diaphanization is needed.

Stüben & Linsenmair (2009) described a combination between bleaching treatment with subsequent musculature digestion to transform ants in glassy specimens. This technique allowed viewing the internal morphology of ants without dissection, but again the DNA is not preserved. To solve this, we propose a first step with PK procedure for cleaning (and saving DNA) followed by a second step of diaphanization procedure using hydrogen peroxide as bleaching agent rather than KOH (even at high concentration of 50%) which has been indicated as better bleaching reagent than KOH (Yeh *et al.* 2008).

Another important point of view against the use of KOH is that the genitalia are traditionally stored in microvials with glycerin in biological collection (Gurney *et al.* 1964) and if the KOH was not properly neutralized, the genitalia can be destroyed with time.

1.3.3. DNA matter: quality, quantity, problems and solutions.

We obtained enough DNA to PCR amplification of the gene COI from soft tissues of large and small animals (Figs. 25-26). Sometimes, however, the DNA quantity was so

low that was not visible in agarose gel (not show). The PCR optimization was used to obtain more target DNA even if low quantity persist.

Herein was performed a second round-PCR, using as DNA template the first round- PCR. This procedure was useful to amplify the DNA even from a specimen that no DNA was detectable in agarose gel of the DNA extract or first round- PCR. This procedure, however, increased the chance of detecting the presence of DNA of some parasites of insect. We detected the endosymbiont *Wolbachia* in Bethylidae, a common contamination problem in insects that use universal COI primers like adopted in our study (Smith *et al.* 2012). We also isolated Coleoptera DNA from Bethylidae species from Thailand. We were not able to distinguish if the alien DNA represents a simple contamination or is something the Bethylidae eat, but Lee & Lee (2012) suggested that universal primers used in COI barcodes can amplify barcode sequences from hosts of parasitoid species or vice-versa. A new approach that could be investigated is identify the host information from the Bethylidae specimens once the BLAST tool indicated similarity a non-identified species of Coleoptera from Thailand.

Overall, we verified that when we used some specimens preserved in acetic acid, formalin, Carnoy or others fixative solutions, the DNA was not properly amplified or extracted (Bisanti *et al.* 2009). DNA quality is correlated to the age and the technique for preservation the stored animals while the DNA quantity is dependent to the source of the tissue for extraction (Quicke *et al.* 1999; Frampton *et al.* 2008; Bisanti *et al.* 2009; Nagy 2010).

Quicke *et al.* (1999) presented some guidelines aiming this perspective and summarized cost-benefice of various preservation protocols. Bisanti *et al.* (2009) discussed some of the preservation methods and showed that absolute ethanol was significantly better fixative than 75% ethanol to obtain high quality of DNA of Diptera, Hymenoptera, and Hemiptera insects, even though both fixers were adequate for preserve external and internal anatomy. Thus, we reiterate the Bisanti *et al.* (2009) recommendation to use absolute ethanol as fixative solution to avoid the degradation of the DNA. Going beyond, we propose to use absolute ethanol even in Malaise traps and avoid other methodologies that use chemicals that could degrade DNA, like killing bottles or use acetate and bleaches to clean externally pinned specimens.

Bisanti *et al.* (2009), however, highlighted the use of acetone as better fixative solution than absolute ethanol in some taxa. The authors suggested that the powder of

ethanol penetration is taxon-specific, explaining why the acetone may assure better effective preservation in aphids (Fukatsu 1999) and moths (Mandrioli *et al.* 2006).

Time is another factor that influences the DNA quality. The more ancient dry or collected specimen, the more degraded was the DNA (Van Houdt *et al.* 2010). Nowadays, some papers showed the possibility to rescue the genetic diversity of specimens from collections to aid in conservation, systematic and taxonomic studies, even from ancient and fossil (Rohland & Hofreiter 2007; Thomsen *et al.* 2010; Houdt *et al.* 2010; Andersen & Mills 2012). These approaches sometimes have problems with fungi and other contamination, especially in dry specimens which can be avoided by design specific primers.

In our study, we were able to extract and amplify good DNA from samples pinned over 30 years using as source of the DNA the genitalia stored into a microvial with glycerin. On the other hand, pinned specimen regularly showed fungi contamination after DNA extraction and amplification. The traditional use of glycerin (or glycerol) and microvials in entomological collections were benefices that we need explore for rescue DNA from collections. Glycerin is a tissue preserver that potentially maintain a better DNA integrity than dryness one (Quicke *et al.* 1999), do not inhibit PCR amplification (Lu & Negre 1993; Nagai *et al.* 1998) and the microvials protect the genitalia from contaminants and some PCR inhibitors, such naphthalene.

We adopted other procedures to avoid low DNA quantity from extraction small species. First, we added more tissue for extraction dissecting the last three segments from abdomen instead only the genitalia. Another option is optimize the DNA extraction procedure. Chen *et al.* (2010) evaluated the efficiency, cost, and side effects from five different methods. Rohland & Hofreiter (2007) and Andersen & Mills (2012) showed some optimization procedure to extract DNA from ancient species. Overall, they showed that commercial kits, usually, recover more DNA than traditional methods. In this case, when the specimen is small or rare, we opt to use a DNA extraction kit. We suit the kit protocol to attempt genitalia preparation procedure using the genitalia as tissue source of DNA and after habitual digestion, we isolated the genitalia pipetting the solution.

1.4. Conclusion

PK procedure showed to be an alternative method to obtain good DNA for PCR proposal that preserves anatomical parts for morphological studies. PK procedure always preserved the texture qualities from genitalia or other sclerotized structures, whereas saved DNA with the best cost-benefice than KOH, even if PK is more expensive. In addition, the genitalia are better prepared that the descriptions and images can have higher quality.

We wondered if the traditional KOH procedure caused the loss of many taxonomic features of specimens all the time that this procedure is traditional adopted due the abrasive effect. Color, texture, hairs integrity and poor sclerotized membranes are some characters that are damaged if the procedure with KOH is not meticulously executed.

Overall, the PK method can be applied in other non-proteins based structures. This method permits using DNA from holotypes without damage more than necessary to describe them. We recommend when holotype will be chosen, select specimen that has usefully DNA extracted. Recover DNA from types has been a solution for controversial systematic and taxonomic cases (Kirchman et al. 2009) and need to be encouraged, further the possibility to extracting DNA preserving holotype integrity. Another good practice is when the sequence is going to be deposited at Genbank, add the information if this sequence belongs to a type specimen.

1.5. Acknowledgements

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES (grant to COA, process 52263010/2011), Conselho Nacional Científico e Tecnológico – CNPq (Grant to VF, process 620068/2008-4), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (MS scholarship to ABM and DNB). We thank to the Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) at Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) for the logistic support, especially Ms. Juliana F. Justino.

1.6. References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Andersen, J.C., Mills, N.J. (2012) DNA extraction from museum specimens of parasitic Hymenoptera. *PLoS ONE*, 7(10): e45549. doi:10.1371/journal.pone.0045549.
- Bajorath, J., Hinrichs, W., Saenger, W. (1988) The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *European Journal of Biochemistry*, 176, 441–447.
- Bisanti, M., Ganassi, S. and Mandrioli, M. (2009), Comparative analysis of various fixative solutions on insect preservation for molecular studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 130, 290–296.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular genetic analyses of populations. A practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 225-269.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H., Siegfried, B.D. (2010) Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE*, 5(8): e11963. doi:10.1371/journal.pone.0011963.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Fukatsu, T. (1999) Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Molecular Ecology*, 8, 1935–1945.
- Gibson, G.A.P. (1993) Groundplan structure and homology of the pleuron in Hymenoptera based on a comparison of the skeletomusculature of Xyelidae (Hymenoptera) and Raphidiidae (Neuroptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 165, 165-187.
- Gurney, A.B., Kramer, J.P., Steyskal, G.C. (1964) Some Techniques for the Preparation, Study and Storage in Microvials of Insect Genitalia. *Annals of the Entomological Society of America*, 57, 240-242.
- Hilz, H., Wieggers, U., Adamietz, P. (1975) Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of ‘masked’ proteins. *European Journal of Biochemistry*, 56, 103–108.

- Van Houdt, J.K.J., Breman, F.C., 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.
- Hundsdoerfer, A.K. & Kitching, I.J. (2010) A method for improving DNA yield from century-plus old specimens of large Lepidoptera while minimizing damage to external and internal abdominal characters. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 68, 151–155.
- Kirchman, J.J., Witt, C.C., McGuire, J.A. & Graves, G.R. (2010) DNA from a 100-year-old holotype confirms the validity of a potentially extinct hummingbird species. *Biology Letters*, 6, 112–115.
- Knölke, S., Erlacher, S., Huasmann, A., Miller, M.A., Segerer, A.H. (2005) A procedure for combined genitalia dissection and DNA extraction in Lepidoptera. *Insect Systematics & Evolution*, 35, 401–409.
- Lee, W., Lee, S. (2012) Unexpected problem in aphid DNA barcoding by universal primers. *Entomological Science*, 15, 121–126.
- Lodge, R.J., Freeland, J.R. (2003) The use of Odonata museum specimens in questions of molecular evolution. *Odonatologica*, 32, 375–380.
- Lu, Y.H., Negre, S. (1993) Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification. *Trends Genetics*, 9, 297.
- Mandrioli, M., Borsatti, F., Mola, L. (2006) Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120, 239–244.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Nagai, M., Yoshida, A., Sato, N. (1998) Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochemistry & Molecular Biology International*. 44, 157–163.
- Nagy, Z.T. (2010) A hands on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms Diversity & Evolution*, 10, 91–105.
- Nihei, S.S., de Carvalho, C.J.B. (2007) Phylogeny and classification of Muscini (Diptera, Muscidae) *Zoological Journal of Linnaean Society*, 149, 493–532.

- Quicke, D.L.J., Belshaw, R., Lopez-Vaamonde, C. (1999) Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study. *Zoologica Scripta*, 28, 261–267.
- Rognes, K. (2009) Revision of the Oriental species of the *Bengalia peuhi* species-group (Diptera, Calliphoridae). *Zootaxa*, 2251, 1–76.
- Rohland, N., Hofreiter, M. (2007) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, 42, 343–352.
- Rohland, N., Siedel, H., Hofreiter, M. (2004) Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analysis of museum specimens. *Biotechniques*, 36, 814–821.
- Rowley, D.L., Coddington, J.A., Gates, M.W., Norrbom, A.L., Ochoa, R.A., Vandenberg, N.J., Greenstone, M.H. (2007) Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Notes*, 7, 915–925.
- Smith, M.A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E.S., Fernandez-Triana, J., et al. (2012) *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. *PLoS ONE*, 7(5): e36514. doi:10.1371/journal.pone.0036514
- Starks, P.T., Peters, J.M. (2002) Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscus*. *Insectes Sociaux*, 49, 20–22.
- Frampton, M., Droege, S., Conrad, T., Prager, S., Richards, M.H. (2008) Evaluation of Specimen Preservatives for DNA Analyses of Bees. *Journal of Hymenoptera Research*, 17, 195–200.
- Stüben, M., Linsenmair, E. (2008) Advances in insect preparation: bleaching, clearing and relaxing ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological news*, 12, 15–21.
- Thomsen, P.F., Elias, S., Gilbert, M.T.P., Haile, J., Munch, K., et al. (2009) Non-destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS ONE*, 4(4): e5048. doi:10.1371/journal.pone.0005048
- Trpis, M. (1970) *A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology*. *Canadian Journal of Zoology*, 48, 892–893.
- Watts, P.C., Thomsson, D.J., Allen, K.A., Kemp, S.J. (2006) How useful is DNA extracted from the legs of archived-insects for micro-satellite based population genetic analysis? *Journal of Insect Conservation*, 11, 195–198.

Yeh, H.T., Ko1, C.C., Hsu, T.C. (2008) Review of the East-Asian genus *Reticulaphis* (Aphididae: Hormaphidinae), with two new species. *Zootaxa*, 1782: 34–48.

1.7. Figures

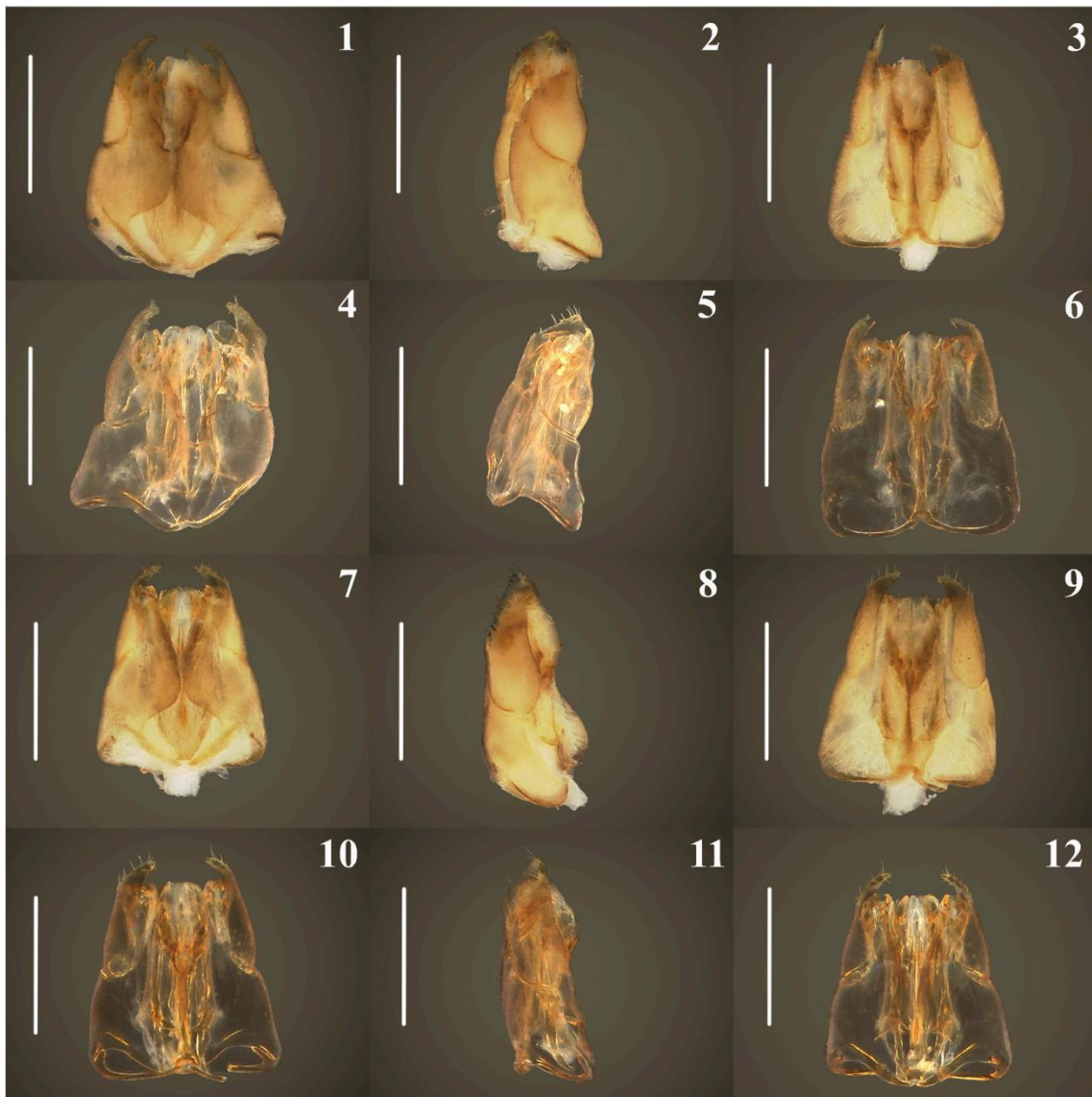


Plate 01:

FIGURES 1-12. Male genital of *Dissomphalus* sp.: Before treatment with KOH . 1. Dorsal view; 2. Lateral view; 3. Ventral view. After treatment with KOH 4. Dorsal view; 5. Lateral view; 6. Ventral view. Before treatment with with Proteinase K. 7. Dorsal view; 8. Lateral view; 9. Ventral view. After treatment with Proteinase K 10. Dorsal view; 11. Lateral view; 12. Ventral view. (scale bars 300 μm).

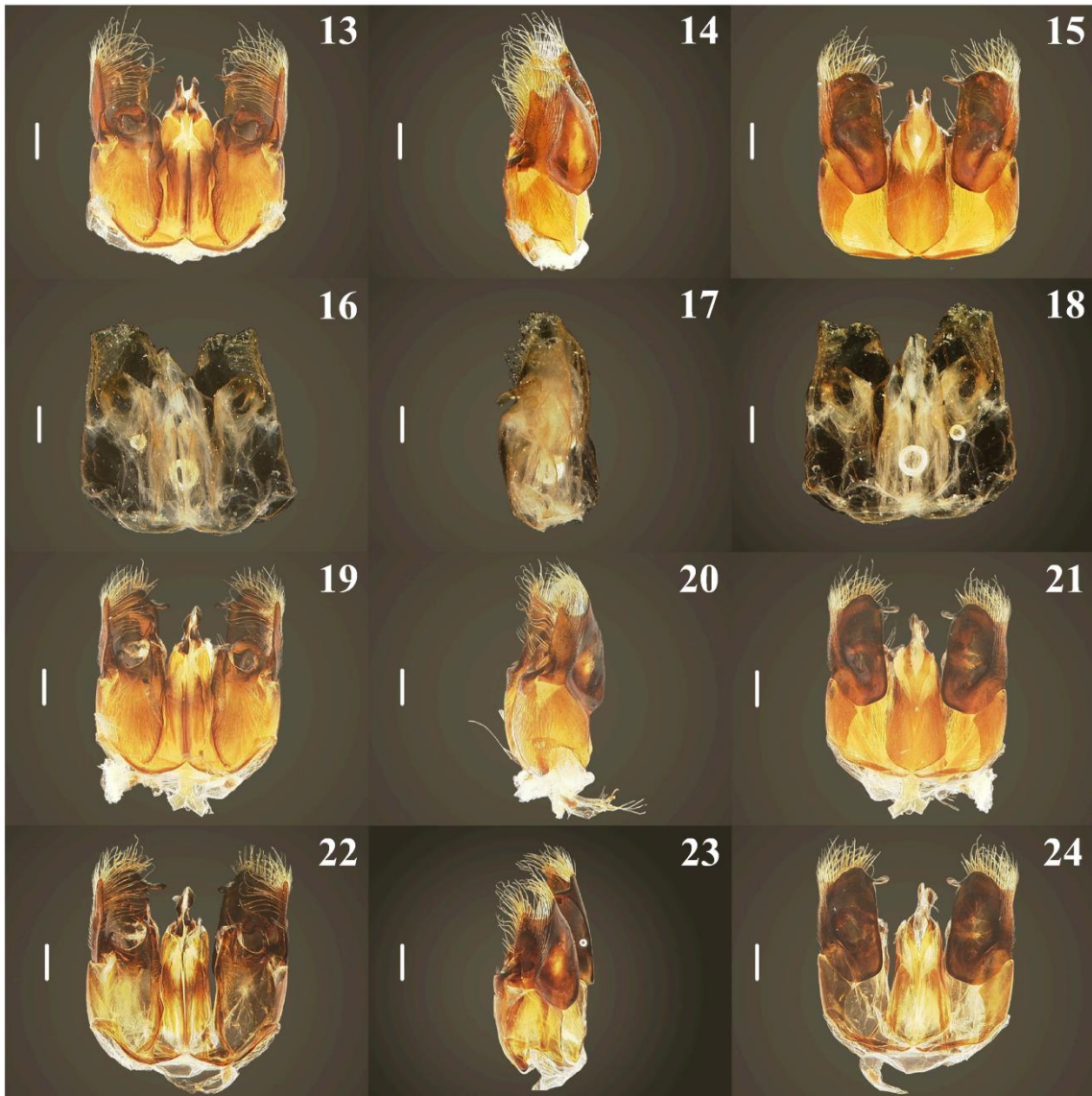


Plate 02:

FIGURES 13-24. Male genital of *Kathepyris* sp. Before treatment with KOH: 13. Dorsal view; 14. Lateral view; 15. Ventral view. After treatment with KOH: 16. Dorsal view; 17. Lateral view; 18. Ventral view. Before treatment with with Proteinase K: 19. Dorsal view; 20. Lateral view; 21. Ventral view. After treatment with Proteinase K: 22. Dorsal view; 23. Lateral view; 24. Ventral view. (scale bars 300 μ m)



Plate 03:

FIGURES 25-26. 25. *Dissomphalus* sp., habitus after dissection of genitalia; 26. *Kathepyris* sp., habitus. (scale bars 300 μ m).

CAPÍTULO 2

Marcadores moleculares na associação macho-fêmea de espécimes de *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae) da Tailândia

2.1. Introdução

Para muitos insetos, o dimorfismo sexual das espécies é tão discreto que permite que machos e fêmeas de uma mesma espécie sejam associados exclusivamente por caracteres diagnósticos compartilhados (Pilgrim & Pitts 2006). No entanto, associar espécimes por semelhanças fenotípicas é arriscado nos casos de táxons que apresentam dimorfismo sexual acentuado (Stubblefield & Seger 1994), pois, neste caso, machos e fêmeas de uma mesma espécie são tão distintos que torna praticamente impossível identificar características diagnosticas da espécie em ambos os sexos.

Existem descritos na literatura métodos tradicionais de associação entre machos e fêmeas que não utilizam semelhanças fenotípicas. Basicamente esses métodos se resumem em observar o comportamento de cópula, o ciclo de vida e eclosão de ovos para assim determinar o fenótipo de ambos os sexos da espécie observada. Contudo, essas abordagens observacionais são de difícil utilização devido, em especial, ao fato da maioria dos espécimes nunca terem sido observados vivos, já que as armadilhas mais comuns de insetos geralmente capturam e fixam imediatamente os exemplares. Essa situação é ainda mais problemática em insetos de tamanho diminuto, como é o caso de muitos Hymenoptera.

De modo geral, a maior parte dos estudos em Hymenoptera é realizada com amostras provenientes de coletas que não requer a presença do coletor durante a captura dos animais. Essa situação dificulta a utilização de métodos tradicionais de associação macho-fêmea, ainda mais em Hymenoptera cujas espécies apresentam dimorfismo sexual acentuado, como os encontrados em Agaonidae (Miyazaki 1987), Mutillidae (Pilgrim & Pitts 2006) e Formicidae (Bolton 1994).

Um dos exemplos mais marcantes de dimorfismo sexual acentuado é observado na subfamília Pristocerinae (Hymenoptera, Bethylidae). Para se ter uma ideia, encontra-se na literatura de Pristocerinae situações em que espécimes machos e fêmeas de um mesmo gênero já foram classificados em gêneros diferentes devido à semelhança grande entre as fêmeas do grupo (Westwood *et al.* 1874; Lanes & Azevedo 2007). Assim, a

existência de erros de classificação devido dimorfismo sexual acentuado das espécie e a semelhança grande entre as fêmeas de gêneros distintos reforça a proposição de que associar espécimes de *Pristocerinae* por semelhanças fenotípicas é duvidoso. Esse fato, provavelmente, é o motivo de a taxonomia do grupo ser restrita a um dos sexos, apesar de existirem gêneros de *Pristocerinae* em que se têm descrito representantes de ambos os sexos devido a casualidades de coleta.

Por exemplo, *Dissomphalus* Ashmead 1893 é um gênero que apresenta machos alados, grandes e de ocelos e olhos desenvolvidos, enquanto as fêmeas são ápteras, pequenas, sem ocelos e com olhos reduzidos (Ashmead 1893). Das 243 espécies de *Dissomphalus*, 14 (5,8 %) são conhecidas exclusivamente por fêmeas e apenas cinco (2 %) apresentam machos e fêmeas descritos (Terayama 2001). Ressalta-se que todas as associações macho-fêmea do grupo se basearam na observação de casais que mantiveram em cópula após a coleta e fixação, o que tipicamente em *Dissomphalus* ocorre por cópula forética (Azevedo 1999; Vargas 2007), na qual o macho alado carrega a fêmea áptera, ambos presos entre si exclusivamente pela genitália (Evans 1969). Ainda que raro, esse comportamento de cópula permite a coleta desses exemplares a partir de armadilhas de interceptação de voo, pois em muitos casos, o casal se mantém acoplado mesmo depois de mortos.

Embora existam casos raros de associação em *Dissomphalus*, há outras restrições que dificultam o trabalho de associação macho-fêmea no grupo. Primeiramente, a sistemática e taxonomia do grupo baseia-se em caracteres masculinos, em especial da genitália (Azevedo 1999, 2000, 2001 e 2003). Em segundo lugar, a variação morfológica das genitálias de machos quando comparada com variação das fêmeas é elevada, o que faz das fêmeas coletadas ficarem excluídas dos estudos. Afinal, pode ocorrer a associação equivocada de machos e fêmeas de uma mesma espécie na ausência de exemplares em cópula forética.

Por um lado, há dificuldade de utilizar as fêmeas na taxonomia de *Pristocerinae*. Por outro, tenta-se incluí-las nos estudos. Atualmente, marcadores moleculares associados aos dados morfológicos têm sido utilizados com sucesso para associar espécimes machos e fêmeas de forma eficiente, sendo, portanto uma alternativa para *Dissomphalus*. Estudos pioneiros realizados por Pilgrim & Pitts (2006) demonstraram o potencial de marcadores nucleares para a associação de espécimes em Mutillidae (Hymenoptera). No estudo, foram utilizadas para associação sexual sequência dos espaçadores internos 1 e 2 (ITS1 e ITS2) visto sua eficácia na taxonomia molecular em

nível de espécie em outros trabalhos com Hymenoptera (Schilthuizen *et al.* 1998; Taylor & Szalanski 1999; Allemand *et al.* 2002).

Assim, o presente trabalho pretende avaliar o potencial de três marcadores moleculares em associar uma fêmea não identificada da Tailândia com as espécies de *Dissomphalus* dessa região. Foi avaliado o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI), um dos mais utilizados em animais como marcador do código de barras de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Hebert *et al.* 2003), além dos segmentos nucleares, ITS2, já demonstrado eficiente em associar espécimes de Mutillidae (Pilgrim & Pitts 2006) e o gene 28S do ácido ribonucleico ribossomal (RNAr 28S) que recuperou filogenias consistentes de Bethyridae (Carr *et al.* 2010).

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Material biológico: A amostra de 2049 exemplares utilizada foi coletada na Tailândia entre 2006-2008 no âmbito do projeto *Thailand Inventory Group for Entomological Research* (TIGER) cuja taxonomia foi revisada recentemente por Mugrabi & Azevedo (2013). Foram selecionados 55 espécimes, sendo dois exemplares machos de cada uma das 27 espécies, além da única fêmea coletada. Todas as amostras estão disponíveis na Coleção Entomológica da UFES. Como grupos externos, foram selecionados três exemplares de Pristocerinae dos gêneros *Protisobrachium* Benoit, *Pseudisobrachium* Kieffer e *Apenesia* Westwood coletados na Tailândia.

2.2.2. Extração e amplificação de DNA: O DNA foi extraído da musculatura da genitália e/ou dos últimos tergitos do metassomo de exemplares secos montados em alfinetes ou fixados mantidos em solução de etanol 100% utilizando-se *kit* de extração NUCLEOSPIN[®] (Macherey-Nagel) seguindo-se o protocolo do fabricante, com modificações (Capítulo 1).

A amplificação dos marcadores COI, 28S e ITS2 foi feita utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as reações foram realizadas em um volume final de 25 µl utilizando-se 2-4 µl de DNA molde no termociclador ABI Veriti[®]. Para amplificar o gene COI foram utilizados os *primers* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') e LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'), específicos para os 650 pb iniciais do gene (Folmer *et al.* 1994). As misturas de PCR continham 1x de solução tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada *primer* e 1 U 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°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 10 minutos.

Para o gene 28S, foram utilizados os *primers* F2 (5'-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') e D3 (5'-TAGTTCACCATCTTTTCGGGTC-3') específicos para a região hipervariável D2-D3 do RNAr 28S (Carr *et al.* 2010). As misturas de PCR continham 1x de tampão da Taq, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada primer e 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 95° C por 60 segundos; (2) 40 ciclos de 95° C por 60 segundos (desnaturação), 50-52° C por 60 segundos (anelamento), 72° C por 90 segundos (elongação); (3) um período de final a 72° C por 10 minutos.

Para o segmento ITS2, foram utilizados os *primers* 5.8S-F (5'-GGCTCGTGGAAATCGATGAAGAACG-3') e 28S rDNA (5'-GCTTATTAATATGCTTAA ATTCAGCGG-3') (Weekers *et al.* 2001). As misturas de PCR continham 1x de tampão da Taq, 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada primer e 1U 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 150 segundos; (2) 40 ciclos de 94° C por 30 segundos (desnaturação), 60° C por 60 segundos (anelamento), 72° C por 60 segundos (elongação); (3) um período de final a 72° C por 10 minutos.

O sucesso da amplificação foi verificado utilizando-se 2 µl do produto de PCR misturados com 2 µl de BlueJuice® (Invitrogen, EUA) submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2,0 % a 100 V por 35 minutos. Foi utilizado o corante intercalante de DNA GelRed® (Biotium) e visualizado sob incidência de luz ultravioleta em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch® (Loccus). Todas as PCR foram feitas acrescentando água Mili-Q como controle negativo em sala isolada (pré-PCR) e as misturas de PCR foram realizadas em uma capela previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 10% e álcool 70%, onde nenhum DNA é manipulado. Para as reações que não geraram um produto de PCR, foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando-se como DNA molde 1,0 µL do produto de PCR da primeira reação, reduzindo-se os ciclos da PCR para 35, evitando-se bandas inespecíficas.

2.2.3. Purificação e Sequenciamento do DNA: Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação ExoSAP-IT® (USB Corporation) seguindo-se o protocolo do fabricante. Esse método de purificação utiliza duas enzimas

hidrolíticas, Exonuclease I e Shrimp Alkaline fosfatase que em uma solução tampão, degradam restos de *primers* e dNTPs, respectivamente. Para isso, adicionou-se a 20 µl do produto de PCR uma alíquota de 2 µl de ExoSAP-IT® diluídos 1:4. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em um espectrofotômetro NanoDrop® e também utilizando-se o marcador de peso molecular Lowmass® (Invitrogen). As sequências foram geradas a partir de um produto de PCR na empresa Macrogen Koreaia (<http://dna.macrogen.com>)

Foi gerada a sequência da fita senso de DNA utilizando-se somente o *primer forward*, mas quando necessário, a fita antissenso foi utilizada para confirmar as ambiguidades. A identidade das sequências foram confirmadas através do método BLAST (Altschul 1997) que compara as sequências geradas com as disponíveis no *GenBank*.

2.2.4. Análises dos dados: As sequências do COI e ITS2 foram alinhadas no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) auxiliado pela opção ClustalX (Thompson *et al.* 1994) e conferidas visualmente. No caso de COI, utilizou-se a estrutura primária da proteína como referencial para o alinhamento. As sequências de RNAr 28S foram alinhadas com o auxílio do programa RNAsalsa (Stocsits *et al.* 2009) que utilizou como referência a estrutura secundária de RNA ribossomal homóloga de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) inclusas no pacote do programa.

Foram geradas três matrizes para as análises. A primeira apenas com as sequências alinhadas do COI e a segunda com as do ITS2 e a terceira com 28S. Utilizaram-se sequências de Bethyridae disponíveis no *GenBank* para compor a matriz final matriz de 28S, identificadas com o nome “Carr” nas filogenias que também foram de amostras coletadas na Tailândia.

A etapa de inferência filogenética foi precedida pela verificação do grau de saturação das sequências no programa DAMBE 5.0.23 (Xia & Xie 2001) através do teste de Xia *et al.* (2003). Além disso, foi utilizado o programa jModelTest 0.1 (Posada 2008) para determinar o modelo evolutivo mais adequado a ser utilizado nas análises, selecionado pelo critério de informação Bayesiano (Schwarz 1978), sendo o GTR+I+G escolhido para todas as análises.

As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando-se o critério de otimização de agrupamento de vizinhos (NJ), além do método Bayesiano (BS). As árvores de NJ foram inferidas no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) na qual a confiabilidade dos cladogramas foram estimados em 1000 replicações pela ferramenta estatística *bootstrap*

(Felsenstein 1985). Somente valores de confiabilidade superiores a 50 foram considerados. As árvores de BS foram inferidas no programa Mr.Bayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) correndo-se duas cadeias de 20 milhões de gerações assegurando-se que o desvio padrão médio das frequências ficaram abaixo de 0,01 e *burnin* de 25%. Somente foram considerados grupos monofiléticos os que apresentaram probabilidade posterior superior a 95.

As divergências genéticas entre a fêmea e os espécimes machos de *Dissomphalus* foram estimadas no MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) com o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) que é tradicionalmente utilizado para esse fim. As mutações do tipo inserções-deleções (*indels*) foram consideradas como sendo deleções completas e por isso não entraram no cálculo.

2.2.5. Associação macho-fêmea: A associação da fêmea de *Dissomphalus* foi inferida pelo compartilhamento de um ancestral comum mais recente com um macho, associada à distância genética. Uma vez associada à fêmea, ela será descrita formalmente. Foram adotados os termos das estruturas corporais propostos por Evans (1964) e Azevedo (1999, 2001)

2.3. Resultados

De 54 exemplares machos, somente de 37 (67%) foi amplificado eficientemente pelo menos um dos três marcadores moleculares (Tabela 1), reduzindo de 27 para 23 espécies reconhecidas para a Tailândia por Mugrabi & Azevedo (*in press*) analisadas no presente estudo. Em relação à fêmea, todos os três marcadores testados foram amplificados com sucesso.

O sucesso baixo foi decorrente de contaminação das reações de PCR assim como o estado degradado de DNA das amostras secas. Das 30 amostras obtidas em álcool, 15 amplificaram sequências de COI que compartilhavam mais de 85% de similaridade genética com coleópteros e lepidópteros, sendo descartadas da análise. Das 25 amostras secas, 10 amplificaram sequências com similaridade genética a *Homo sapiens*, sendo nove haplótipos de origem polinésia e uma inglesa, além de três contaminações com fungos.

As sequências amplificadas apresentaram variações de tamanho em alguns casos. Foi observada uma variação de 700-1100 pb (pares de bases) no ITS2 dependente

da espécie, enquanto que para o RNAr 28S e COI foram amplificados fragmentos de tamanhos esperados, por volta de 700 e 650 pb, respectivamente.

As sequências de COI alinhadas revelaram uma matriz de 648 pb que foram analisadas integralmente, já que não apresentaram saturação em nenhuma das posições de códon (índice de saturação de sequências menor que o valor crítico, $ISS < ISS.C$). Foram observadas mutações do tipo *indel*, sendo deleção de um bloco de seis nucleotídeos em *Pseudisobrachium*, de dois blocos de três nucleotídeos em *D. nandus* e de um bloco de três nucleotídeos em *D. wucheanus*, correspondentes a um ou dois aminoácidos. Ressalta-se que cada uma dessas *indels* encontradas ocorreu em sítios particulares, não sendo compartilhados entre nenhum dos táxons analisados.

Nas sequências de 28S alinhadas, obteve-se uma matriz de 776 pb na qual observou-se a existência de mutações do tipo *indels* em vários táxons, também sem qualquer padrão compartilhado entre as espécies. Para complementar, foi adicionada duas sequências de RNAr 28S *Dissomphalus* da Tailândia (GU213950.1 e GU213951.1) identificadas na filogenia como “Carr” no final.

Nas inferências filogenética de 28S e COI, tanto as árvores de NJ e BS foram semelhantes, diferindo-se basicamente nos valores de suporte do clado, aqui optando-se em mostrar apenas as árvores de BS (Figura 28). Observa-se que todas espécie comportaram-se como agrupamentos monofiléticos nos casos em que mais de um indivíduo por espécie estava disponível, com exceção de *D. thaianus*. Além disso, as divergências genéticas intraespecíficas não foram superiores a 5,0 % em COI (com exceção de *D. thaianus*) e 0,4 % em 28S enquanto as interespecíficas foram sempre superiores a 16,5% no COI. Assim os dados genéticos só reforçam a identidade das espécies de Mugrabi & Azevedo (2013).

Tanto as inferências filogenéticas (Figura 28) quanto as distâncias genéticas de 28S (Tabela 2) e COI (Tabela 3) posicionam o espécime fêmea a *D. verus* com divergência correspondente a um padrão intraespecífico (3% em COI, 0-0,06% em RNAr 28S). No entanto, ressalta-se a mesma variação de distância genética do RNAr 28S encontrada entre a fêmea e *D. verus* é observada com a espécie *D. daneus*.

No caso das sequências de ITS2 a associação macho-fêmea foi possível pela análise de similaridade de sequência e compartilhamento de *indels*, uma vez que as sequências de ITS2 são tão distintas entre as espécies que não foi possível realizar um alinhamento para se inferir filogenias (Figura 27).

De modo geral, a associação da fêmea e *D. verus* pôde ser observada no marcador ITS2 a partir dos padrões compartilhados de *indels* obtidos após a tentativa de alinhamento (Figura 27b). Por exemplo, após alinhamento de ITS2, a matriz atingiu mais de 1800 pb devido aos *indels* numerosos. Aproximadamente os 100 primeiros pares de bases do alinhamento de ITS2 correspondem a uma região conservada do marcador 5.8S, local para qual os *primers* foram desenhados (Figura 27a). Essa região apresenta 90-95% de similaridade com o gene RNAr 5.8S de Ichneumonidae, outra família vespa parasitoide, que é o grupo presente no *Genbank* mais similar aos Bethylidae amplificados.

De um lado, observam-se *indels* longos, de até 200 sítios na sequência do ITS2, distribuídos sem padrão definido entre os espécimes de espécies diferentes. Por outro, observaram-se trechos curtos de até 20 pb (Figura 27d) compartilhados entre todos os espécimes analisados. Para a confirmação da associação, foi realizada a análise de distância genética utilizando as espécies mais relacionadas filogeneticamente à fêmea observada nas árvores de COI e RNAr 28S (*D. epitus*, *D. verus*, *D. prilus* e *D. daneus*). Foi observado que a fêmea apresenta distância genética de 61,3% com *D. epitus*, 1,3% com *D. verus*, 56,8-61,1% com *D. prilus* e 15,9% com *D. daneus*, sendo a variação existente com *D. verus* foi resultante exclusivo de transições e transversões ao invés de *indels* (Figura 27c). Dessa forma, ITS2 também indica que a fêmea pode ser associada à *D. verus*, mesmo que a filogenia não tenha sido inferida e nem a distância genética par-a-par.

***Dissomphalus verus* Mugarbi & Azevedo, in press**

(Figuras 29–32)

Descrição da fêmea. Fêmea. Comprimento do corpo 1,94 mm; LH 0,49 mm. Cor. Corpo castanho.

Cabeça (Fig. 29-30). Cabeça longa, 1,40 X tão longa quanto larga em vista dorsal, laterais levemente convexas, quase paralelas, com cantos arredondados. Fronte coriácea, com muitos pontos diminutos. Mandíbula com quatro dentes apicais, dente inferior maior que os demais. Clípeo com lobo mediano arredondado, com borda crenulada, carena mediana completa, alta e angulada em vista lateral. Antena com escapo 2,80 X tão longo quanto largo, flagelômeros 0,50 X tão longo quanto largo. Olho muito pequeno, com seis facetas, 1,60 X tão distante da mandíbula quanto seu

comprimento. Carena occipital visível em vista dorsal. Vértice com leve concavidade na região mediana em vista dorsal.

Mesosomo (Fig. 31-32). Fortemente coriáceo. Disco pronotal delgado, 1,40 X tão longo quanto largo; margem anterior côncava, cantos anteriores arredondados, pontuação esparsa. Mesoscuto 1,10 X tão largo quanto longo; região mediana mais alta que regiões anterior e posterior. Disco propodeal plano, 1,60 X tão longo quanto largura posterior, com constrição leve no terço anterior, carena lateral forte e bem definida; espetáculo inteiramente localizado na lateral do propódeo, tocando a carena lateral no terço anterior. Pernas não espinhosas. Garras simples.

Metassomo. Polido, 0,70 X comprimento do mesossomo. Pecíolo largo, 0,60 X tão longo quanto largo, ondulado transversalmente em vista dorsal.

Material examinado. 1 ♀, THAILAND, Ubon Ratchathani, Pha Taem NP, First level-Huay Sa-nhom waterfall, 15°27.407'N 105°34.867'E, 230m, Malaise trap, 2-9.v.2007, Sorawit Mingman leg. T2185.

Comentários. As facetas dos olhos são quase indistinguíveis.

Distribuição. Tailândia (Chiang Mai, Chanthaburi, Kanchanaburi, Ubon Ratchathani e Surat Thani).

2.4. Discussão

2.4.1. Variações de tamanho de ITS2

Um aspecto muito particular foi observado com a variabilidade grande das sequências de ITS2 de *Dissomphalus* entre as 22 espécies analisadas. Não foi possível estabelecer a homologia dos nucleotídeos quando todas as sequências são analisadas juntas, as quais poderiam colocar em questionamento se as sequências obtidas realmente são homólogas ao ITS2. No entanto, foi descartada a hipótese de que as sequências não corresponderiam a sequências ortólogas do ITS2 uma vez que observou-se a semelhança de mais de 85% dos primeiros 100 pb das sequências com o RNAr 5,8S de famílias de vespas parasitoides presentes no *GenBank*, uma porção inicial do fragmento alvo dos *primers* utilizados.

Trabalhos que utilizam ITS2 em táxons de Hymenoptera e outros animais revelam que esse marcador varia muito de tamanho (Weekers *et al.* 2001, Vobis *et al.* 2004, De la Rúa *et al.* 2007). Ressalta-se que os trabalhos com ITS2 geralmente discutem que o tamanho desse segmento pode ser usado como marcador espécie- e

gênero-específico (Kumara *et al.* 2009). Já foi demonstrado que sequências de ITS2 podem ser mais informativas que genes mitocondriais para estudos populacionais em Hymenoptera (Oh *et al.* 2009). No entanto, a diversidade de ITS2 dos *Dissomphalus* da Tailândia é tão grande que as sequências quando analisadas em conjunto sequer permitem a comparabilidade entre si.

De modo geral, a análise molecular dos *Dissomphalus* se insere em um contexto de comparação interespecífica. Nesse contexto de comparação, observa-se que em Mutillidae (Wilson & Pitts 2010), Odonata (Weekers *et al.* 2001), Siphonaptera (Vobis *et al.* 2004) e outros grupos, marcadores de ITS2 foram comparáveis entre as espécies, obtendo-se árvores filogenéticas intergenéricas robustas. Porém, em *Dissomphalus*, a diversidade desse segmento foi destacadamente diferente, muito elevada, sem possibilidade de se realizar comparações extensas, exceto em alguns trechos pequenos de cerca de 20 pb que não apresentam variação.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para justificar a diversidade alta desse segmento nesse grupo. Por exemplo, Kumara *et al.* (2009) realizaram um estudo buscando alternativas moleculares para se identificar espécies exóticas de Trichogrammatidae (Chalcidoidea) introduzidas na Índia com fins de controle biológico. Os autores encontraram que apenas com o tamanho do ITS2, foi possível agrupar 12 espécies de Trichogrammatidae em três grupos. Um grupo de ITS2 variando de 800-900 pb referentes a duas espécies locais do gênero *Trichogrammatoidea* e outros dois grupos referentes a espécies exóticas de um outro gênero, *Trichogramma*, um grupo com variação de 500-560 pb e outro com 570-630 pb. O que chama atenção no caso é que cada um dos dois agrupamentos de *Trichogramma* aparentam estar relacionados com uma mesma origem biogeográfica das espécies do grupo. Assim, pode-se supor que a variação de *Dissomphalus* da Tailândia seja tão grande, pois a fauna do local seja uma composição de indivíduos ou espécies de origens biogeográficas distintas.

Ainda assim, intriga o fato de não haver comparabilidade. No entanto, ressalta-se que o ITS2 apresenta comparabilidade intraespecífica nos poucos casos em que se obteve mais de uma sequência por espécies ou quando foram analisados pequenos grupos que compartilham ancestrais comuns mais recentes (evidências observadas nas filogenias dos genes COI e RNAr 28S).

Isso pode indicar que *Dissomphalus* seja um grupo muito antigo de tal forma que o marcador ITS2 que já se demonstrou evoluir muito rápido, ficou incomparável ao longo de muitos anos de evolução.

2.4.2. Associação sexual

Nossos dados sobre a associação macho-fêmea nos três marcadores utilizados não deixam dúvidas de que tanto a fêmea quanto os machos *D. verus* pertençam ao mesmo táxon do ponto de vista genético, com divergência baixa e compartilhamento de mesmo clado. O que deve ser avaliado é se ambos os espécimes compartilham um ancestral único e exclusivo por pertencer a uma mesma espécie, grupo de espécie, ou categorias taxonômicas superiores. Assim, faz-se necessário discutir os problemas metodológicos inerentes à associação molecular, para concluir qual categoria taxonômica *Dissomphalus verus* e a fêmea se correlacionam.

De modo geral, a metodologia molecular para a associação apresentada por Pilgrim & Pitts (2006) pode ser resumida como uma utilização clássica de sequências de DNA como código de barras espécie-específico. A diferença está no fato da existência de uma problematização taxonômica na qual há dificuldade de se reconhecer a que espécie pertence às fêmeas devido ao dimorfismo sexual acentuado. Portanto, conforme uma das premissas do código de barras de DNA, é necessário definir geneticamente as espécies. O modo mais utilizado é relacionar uma sequência de DNA a um ou mais indivíduos que tenha sido formalmente incluído em uma espécie bem definida, com divergência de sequência compatível com uma variação intraespecífica. No caso de essa sequência não corresponder a uma espécie conhecida, há a necessidade de uma avaliação da possibilidade de se tratar de uma espécie nova. De uma forma ou de outra, será possível gerar um banco de dados para estudos posteriores de identificação de espécies ou de associação macho-fêmea.

Sistemas de identificação molecular se aprimoraram com desenvolvimento de métodos novos em biologia molecular (Avice 2004). Marcadores moleculares têm se mostrado efetivos no reconhecimento de espécies, sendo uma ferramenta importante para sanar dúvidas sobre a taxonomia de diversos grupos (Avice 2004, Hebert *et al.* 2003, Smith *et al.* 2008). Hebert *et al.* (2003) foram pioneiros no estabelecimento de um protocolo de identificação molecular de espécies e sugeriram que a diversidade genética contida no gene COI seria suficiente para identificar todos os táxons animais de modo espécie-específico. Para tanto, o grupo idealizou a criação de uma plataforma *online*,

denominado BOLD (*The DNA Barcode of Life Data System*), que informatiza sequências de 650 pb do COI isoladas de amostras previamente identificadas por taxonomistas para que seja utilizada como referência de identificação (Ratnasingham & Hebert 2007).

O procedimento padrão para a identificação molecular de espécies admite que uma espécie só será identificada caso houver alguma sequência na plataforma BOLD com similaridade genética maior do que 97%. Ou seja, as espécies do ponto de vista genético do COI são delimitadas a partir de uma medida fenética, admitindo-se 3% como os limites específicos.

Pilgrim & Pitts (2006), por exemplo, utilizaram ITS1 e ITS2 em detrimento do COI para realizar associação macho-fêmea em Mutillidae. Concluíram que não é possível delimitar valores de corte fixos para se definir espécie, uma vez que táxons de grupos diferentes estão sujeitos a uma história evolutiva única e diferenciada, fazendo com que 3% seja um número arbitrário. Assim, Pilgrim & Pitts (2006) abandonaram valores fixos para limites de espécie e propuseram que a associação molecular em Mutillidae fosse baseada no estabelecimento dos limites genéticos intra e interespecíficos das espécies já conhecidas, e posteriormente fosse realizada a comparação dos valores obtidos com as fêmeas de interesse.

Em princípio, entendemos que não há problemas em estabelecer critérios para definir os limites fenéticos das espécies. Aliás, o procedimento adotado por Pilgrim & Pitts (2006) é um recurso metodológico ideal para lidar com o problema típico do código de barras de DNA que é a definição do valor de corte da distância genética que diferencia espécies. No entanto, o problema nessa associação encontra-se no fato da fêmea ter que ser associada a uma das espécies amostradas e não haver a previsão de tratem de espécies novas. Afinal, não há garantias de que a espécie a que fêmea pertence realmente tenha sido amostrada geneticamente no referido estudo ou até mesmo que a fêmea seja uma espécie diferente daquelas dos machos amostrados.

Há na literatura algumas práticas que podem ser usadas como forma de amenizar o problema de amostragem apresentado. Por exemplo, existem descrições de machos e fêmeas em Bethyidae que foram feitas exclusivamente devido ao fato dos exemplares terem sido coletados na mesma localidade ou armadilha, e por ter sido encontrada somente uma única espécie na referida localidade (Terayama 2001). No entanto, essa prática pode ser criticada, pois não há garantias de que os espécimes fêmeas e machos distintos morfologicamente sejam realmente pertencentes a uma mesma espécie devido

ao dimorfismo sexual acentuado e ausência características diagnósticas da espécie compartilhadas em ambos os sexos.

É no sentido de se amenizar o problema de amostragem que incluímos a utilização de inferências filogenéticas moleculares como metodologia complementar para a associação, algo que não foi utilizado por Pilgrim & Pitts (2006), pois esses autores consideraram que somente os valores absolutos de distância genética seriam suficientes. Inferências filogenéticas recuperam a história evolutiva de ancestralidade e descendência, podem revelar também as distâncias genéticas se usados os filogramas, representando uma abordagem mista e complementar a Pilgrim & Pitts (2006).

Ainda, filogenias recuperam agrupamentos naturais e o fato de fêmeas e machos compartilharem um ancestral comum único e exclusivo com outros indivíduos pode ser usado como critério para descartar possibilidades de associação com indivíduos que estão em outros clados, algo que pode ser feito sem a utilização de valores de distância genética. Por exemplo, nas árvores filogenéticas de COI e 28S, a fêmea compartilha um ancestral comum com *D. epitus*, *D. verus*, *D. prilus* e *D. daneus*, cujas características morfológicas permitiriam agrupá-los em um grupo de espécies. Esses táxons possuem genitália bastante alongada (muito mais longa que larga), edeago dividido em dois pares lobos externos, sendo o lobo externo dorsal com aspecto semelhante entre si, hipopígio com haste muito longa e processo tergal com borda lateral externa muito mais alta que a superfície do tergito II e com depressão tão desenvolvida que ultrapassa a margem posterior do tergito II, atingindo a margem anterior do tergito III (D. Mugarbi, comunicação pessoal). Ou seja, embora a fêmea não apresente características masculinas de *Dissomphalus* como hipopígio ou processo tergal, ela pertencerá a uma das espécies que faz parte desse grupo de espécies, independente do valor de distância genética dela com todas as outras espécies analisadas. Assim, é no contexto de aliar dados morfológicos e moleculares nas filogenias que a associação macho-fêmea é promissora já que se pode representar um facilitador na identificação e associação de espécimes.

É possível ir mais além, somando-se os dados de distância genética, inferência filogenética e morfologia. Primeiro *D. verus* e a fêmea formam um grupo monofilético com suporte alto em 28S e COI. Isso já indica que se a fêmea não pertencer a *D. verus*, pelo menos ambos são táxons irmãos. Segundo, as sequências de COI da fêmea e do macho de *D. verus* tem divergência de 3%, enquanto que a divergência com os machos das espécies mais próximas filogeneticamente varia de 16,5% com *D. prilus* a 23,6%

com *D. daneus*, sendo essas as menores distâncias genética observadas em relação aos demais táxons dos outros clados. Assim, embora possa parecer alto, o valor de 3% de divergência do COI em *Dissomphalus* é compatível com uma divergência intraespecífica dentro dos critérios do BOLD para qualquer grupo animal. Assim, pode-se sugerir que *D. verus* e fêmea pertença à mesma espécie, embora não se possa ignorar a possibilidade de existência de espécies crípticas.

Constantemente nos trabalhos que avaliam o código de barras de DNA em insetos são encontrados casos potenciais de espécies crípticas (Hebert *et al.* 2004; Smith *et al.* 2006). Smith *et al.* (2008), por exemplo, testaram código de barras de DNA em 2597 indivíduos de vespas parasitóides de seis gêneros de Ichneumonidae (Hymenoptera), utilizando-se de uma abordagem multidisciplinar somando-se dados morfológicos e ecológicos. Previamente aos estudos moleculares, os taxonomistas classificaram os 2597 exemplares em 171 espécies. No entanto, a análise do COI revelou 313 espécies, com incremento de 95% de espécies descritas. Para corroborar os dados de COI, os autores examinaram sequências de 28S e concluíram que se associado aos dados ecológicos, as 313 espécies moleculares apresentam diagnoses além de características moleculares.

Com base nos casos de espécies crípticas, pode-se questionar se no agrupamento monofilético que a fêmea e *D. verus* pertencem, não existam espécies crípticas. Por outro lado, do ponto de vista morfológico não há suspeitas da *D. prilus* ser um complexo de espécies se considerada a natureza particular da genitália e processo tergal dessa espécie. Ainda mais que se considerado o esforço amostral do projeto TIGER (coleta pelo período de três anos em mais de 20 parques nacionais da Tailândia), potencialmente sugere terem sido esgotadas as possibilidades de espécies distintas morfológicamente entre si não terem sido amostradas. Do ponto de vista genético, as espécies parecem ser bem estruturadas o que corrobora com os dados morfológicos, mesmo que poucos indivíduos tenham sido amostrados por espécie e espécie. Logo, é razoável descrever a fêmea amostrada como pertencente à mesma espécie de *D. verus* até que se demonstre a existência de espécies crípticas nesse táxon, afinal suspeitas de espécies crípticas não deve ser considerada como empecilho para a formalização de descrições taxonômicas.

A partir dos dados obtidos, observou-se que COI, RNAr 28S e ITS2 indicaram a mesma associação macho-fêmea. No entanto, percebe-se que do ponto de vista de distância genética, COI e RNAr 28S foram mais apropriados que ITS2, sendo COI

melhor que os demais por apresentar uma variação comparável sem deixar dúvidas sobre a associação. Diferentemente o RNAr 28S apresentou uma variação genética que poderia confundir a associação caso a metodologia se restringisse à matriz de distância genética. No caso, a distância genética da fêmea com *D. prilus* e *D. daneus* apresentam intervalo de variação compatíveis, apesar da filogenia não revelar essa dúvida.

Assim, conclui-se que a metodologia de associação é promissora para resolver problemas taxonômicos decorrentes da classificação equivocada. Será possível utilizar da associação molecular para avaliar a validade de espécies de elevado dimorfismo sexual que apresentam holótipos femininos, como é o caso das 14 espécies de *Dissomphalus* conhecidas apenas por fêmeas. Isso permitirá reconhecer, resolver e até evitar problemas de sinonímias nos grupos de insetos dimórficos.

2.5. Referências

- Allemand R, Lemaitre C, Frey F, Bouletreau M, Vavre F, Norlander G, Alphen J, Carton Y (2002) Phylogeny of six African Leptopilina species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of Drosophila, with description of three new species. *Annales de la Societe Entomologique de France*, 38:319–332.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.
- Ashmead WH (1893) Monograph of the North American Proctotrypidae. *Bulletin of the United States National Museum*, 45:1–472.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- Azevedo CO (1999) On Neartic *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae), with the description of two new species from Florida. *Iheringia*, 87:49-56.
- Azevedo CO (2000). The dumosus group of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae): definition and description of a new amazonian species. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 16:91-97.
- Azevedo CO (2001) Systematics of the Neotropical *Dissomphalus* Ashmead (Hymenoptera, Bethylidae) of the bicavatus group. *Revista Brasileira de Entomologia*, 45:173-205.

- Azevedo CO (2003) Synopsis of the Neotropical *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 338:1-74.
- Bolton B (1994) *Identification Guide to the Ant Genera of the World*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 232 pp.
- Carr JW, Young M, Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics & Evolution*, 41:55–73.
- De La Rúa P, May-Itzá W, Serrano J, Quezada-Euán JJG (2007) Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 54:418-423.
- Evans HE (1954) The North American species of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 56:288-309.
- Evans HE (1969) Phoretic copulation in Hymenoptera. *Entomological News*, 80:113-124.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SI, Waard Jr (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270:313–321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Ehallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:14812-14817.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754-755.
- 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.
- Kumara GA, Jalalia SK, Venkatesana, Stouthamerb R, Niranjanaa P, Lalithaa Y (2009) Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS-2-RFLP) tool to differentiate some exotic and indigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. *Biological Control*, 49:207-213.

- Lanes GO, Azevedo CO (2007) Redescription and placement of the Oriental *Scaphepyris rufus* Kieffer (Hymenoptera, Bethyilidae). *Zootaxa*, 1654:55-60.
- Miyazaki, M. (1987) Forms and Morphs of Aphids. In AK Minks and Harrewijn P (eds.). *Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control*, pp. 27–50. Vol. 2A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 450 pp.
- Mugrabi D. (2011) **Dissomphalus da Tailandia**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- Mugrabi D, Azevedo CO (2013) Review of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethyilidae) from Thailand. *Zootaxa*, *in press*.
- Oh HK, Yoon HJ, Kim MJ, Jeong HU, Kim SR, Hwang JS, Bae CH, Kim I (2009) ITS2 ribosomal DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). *Genes Genomics*, 31: 293– 303.
- Pilgrim EM, Pitts JP (2006) A Molecular Method for Associating the Dimorphic Sexes of Velvet Ants (Hymenoptera: Mutillidae) *Journal of The Kansas Entomological Society*, 79:222–230.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25:1253-1256.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7:355-364.
- Schilthuizen M, Norlander G, Stouthamer R, Van Alphen J (1998) Morphological and molecular phylogenetics in the genus *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Systematic Entomology*, 23:253–264.
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6:461-464.
- Smith MA, NE Woodley, DH Janzen, W Hallwachs. PDN Hebert (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:3657-3662.
- Smith MA, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Dean AR, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN (2008) Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:12359–12364.

- Stocsits RR, Letsch H, Hertel J, Misof B, Stadler PF (2009) Accurate and efficient reconstruction of deep phylogenies from structured RNAs. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkp600A.
- Stubblefield JW, Seger J. (1994) Sexual dimorphism in the Hymenoptera. In: Short RV, Balaban E, editors. The differences between the sexes. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p 71–103.
- 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* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Taylor Db, Szalanski AI (1999) Identification of Muscidifurax spp. by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biological Control*, 15:270–273.
- Terayama M (2001) Descriptions of seven new species of the genus *Dissomphalus* Ashmead (Hymenoptera, Bethyridae) from the Oriental Region. *Japanese Journal of Systematic Entomology*, 7:81-90.
- Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673–4680.
- Vargas JM (2007) First Record Of Phoretic Copulation In *Dissomphalus Xanthopus* Ashmead (Hymenoptera: Bethyridae) *Entomological News*, 118:470-474.
- Vobis M, D'haese J, Mehlhorn H, Mencke N, Blagburn BI, Bond R, Denholm I, Dryden Mw, Payne P, Rust Mk, Schroeder I, Vaughn Mb, Bledsoe D (2004) Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94:219–226.
- Weekers HH, De Jonckheere JF, Dumont HJ (2001) Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20:89–99.
- Westwood JO, Hope FW, Pettigrew TJ (1874) *Thesaurus Entomologicus Oxoniensis, Or, Illustrations of New, Rare, and Interesting Insects, for the Most Part Contained*

*in the Collections Presented to the University of Oxford By the Rev. F.W. Hope ...
With Forty Plates From Drawings By the Author.* Oxford: At the Clarendon press.

- Wilson JS, Pitts PP (2010) Phylogeographic analysis of the nocturnal velvet ant genus *Dilophotopsis* (Hymenoptera: Mutillidae) provides insights into diversification in the Nearctic deserts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101:360–375.
- 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.
- Xia X. & Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92:371-373.

2.6. Tabelas e figuras

Tabela 1: Relação dos exemplares em que pelo menos um dos marcadores foi sequenciado.

Espécime	Identificação	COI	28S	ITS2	Localidade	Latitude	Longitude
Não identificado	Fêmea D48 T2185	x	x	x	Ubon Ratchathani	15.5630	105.8075
D. Chiangmaiensis	T3080	x		x	Nakhon Si	8.2872	99.8744
D. Chiangmaiensis	T3104	x	x		Nakhon Si	8.3061	99.8803
D. thaianus	Dthaianus	x		x			
D. thaianus	Dthaianus T1097	x	x		Sakon Nakhon	16.9166	103.9739
D. thaianus	Dthaianus T3665	x	x	x	Kamphaeng Phet	16.1422	99.2597
D. wucheanus	Dwucheanus T1060			x	Ubon Ratchathani	15.5433	105.5833
D. wucheanus	Dwucheanus T2810	x	x	x	Chiang Mai	20.1764	99.2864
D. epitus	M01 T3428	x	x		Kanchanaburi	14.7533	98.9305
D. epitus	M01 T566	x		x	Phitsanulok	17.0114	101.115
D. verus	M02 A11	x	x	x			
D. verus	M02 A14		x				
D. prilus	M04 T2974	x	x	x	Chanthaburi	13.0164	102.2003
D. prilus	M04 T4766		x	x	Kanchanaburi	14.7533	98.8931
D. daneus	M06 T3177	x	x	x	Chiang Mai	19.4166	98.9166
D. daneus	M06 T3432	x		x	Kanchanaburi	14.6711	99.2158
D. daneus	M06 T4746		x		Kanchanaburi	14.7200	99.1619
D. gabus	M10 T2243	x			Nakhon Nayok	14.4166	111.3666
D. gionus	M12 T1035	x		x	Chaiyaphum	15.7894	101.4442
D. cherrus	M13 T3080		x	x	Nakhon Si	8.2872	99.8744
D. julius	M14 T2977		x	x	Chanthaburi	13.0164	102.2003
D. davus	M16 T121	x			Chiang Mai	18.6836	98.5269
D. davus	M16 T56	x			Chiang Mai	18.6719	98.7447
D. zethus	M18 T106	x	x		Khonkaen	16.7213	102.6927
D. zethus	M18 T1476			x	Ubon Ratchathani	15.6725	105.6244
D. hetus	M20 T991		x	x	Nakhon Nayok	14.4831	101.5672
D. jolus	M21 T202	x	x	x	Sakon Nakhon	17.1744	104.1047
D. nandus	M23 T3127		x		Suphanburi	15.2058	99.6481
D. jubus	M24 T1097	x	x	x	Sakon Nakhon	16.9166	103.9739
D. jubus	M24 T1102	x		x	Sakon Nakhon	16.9333	103.9439
D. turinus	M27 2810 1	x		x	Chiang Mai	20.1764	99.2864
D. turinus	M27 2810 2	x		x	Chiang Mai	20.1764	99.2864
D. paulus	M30 T1020	x		x	Phetchabun	16.7333	101.5666
D. barbus	M31 T428	x			Phetchabun	16.75	101.4666
D. robus	M32 T286			x	Sakon Nakhon	17.0986	104.3494
D. magnetus	M35 T568	x	x		Phitsanulok	16.9219	101.07
D. lidinus	M37 T2812 #1	x			Kamphaeng Phet	16.3522	99.2311
D. lidinus	M37 T2812 #2	x		x	Kamphaeng Phet	16.3522	99.2311
Apenesia sp.	Apenesia	x	x	x	Chiang Mai	20.1764	99.2864
Protisobrachium sp.	M22 T1060	x		x	Ubon Ratchathani	15.45	105.5833
Pseudisobrachium sp.	Pseudisobrachium A	x		x	Chiang Mai	20.1764	99.2864

Tabela 2: Estimativa de divergência evolutiva par-a-par entre sequências de 28S de *Dissomphalus* da Tailândia expressas em porcentagem.

Amostra	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	26	27	28
1 Femea_DOC48_T2185																												
2 Dchiangmaiensis_T3104	5.90																											
3 Dissomphalus_sp_1_Carr	3.97	5.89																										
4 Dissomphalus_sp_3_Carr	3.97	5.89	0.00																									
5 Dthaianus_T1097	2.42	4.29	3.96	3.96																								
6 Dthaianus_T3665	2.73	4.62	4.28	4.28	0.30																							
7 Dwucheanus_T2810	2.42	3.98	3.34	3.34	1.80	2.11																						
8 Depitus_M01_T3428	1.20	6.54	3.97	3.97	3.04	3.35	3.03																					
9 Depitus_M01_T556	1.20	6.54	3.97	3.97	3.04	3.35	3.03	0.00																				
10 Dverus_M02_A11	0.60	6.54	4.60	4.60	3.04	3.35	3.03	1.80	1.80																			
11 Dverus_M02	0.00	5.90	3.97	3.97	2.42	2.73	2.42	1.20	1.20	0.60																		
12 Dprilus_M04_T2974	0.90	5.57	4.29	4.29	2.73	3.04	2.73	1.50	1.50	1.50	0.90																	
13 Dprilus_M04_T4766	0.60	5.24	3.97	3.97	2.42	2.73	2.42	1.20	1.20	1.20	0.60	0.30																
14 Ddaneus_M06_T3177	0.30	5.57	3.65	3.65	2.11	2.42	2.11	0.90	0.90	0.90	0.30	0.60	0.30															
15 Ddaneus_M06_T3432	0.60	5.89	3.97	3.97	2.42	2.73	2.41	1.20	1.20	1.20	0.60	0.90	0.60	0.30														
16 Dcherrus_M13_T3080	3.35	3.03	3.65	3.65	2.11	2.41	1.20	3.97	3.97	3.97	3.35	3.03	2.72	3.03	3.34													
17 Djulius_M14_T2977	2.42	3.98	3.34	3.34	1.80	2.11	0.00	3.03	3.03	3.03	2.42	2.73	2.42	2.11	2.41	1.20												
18 Dzethus_M18_T106	2.42	3.35	3.97	3.97	1.80	2.11	1.20	3.04	3.04	3.04	2.42	2.73	2.42	2.11	2.42	2.11	1.20											
19 Dhetus_M20_T991	4.29	3.98	2.42	2.42	3.03	3.35	2.42	4.29	4.29	4.93	4.29	4.62	4.29	3.98	3.97	2.41	2.42	3.04										
20 Djolus_M21_T202	3.99	3.98	4.28	4.28	2.73	2.42	1.81	4.62	4.62	4.62	3.99	3.67	3.36	3.67	3.98	1.20	1.81	3.04	3.03									
21 Dnandus_M23_T3127	2.11	3.66	3.65	3.65	2.11	2.42	1.50	2.73	2.73	2.73	2.11	2.42	2.11	1.80	2.11	2.42	1.50	0.30	3.36	3.36								
22 Djubus_M24_T1097	6.89	5.57	7.19	7.19	5.57	5.24	4.30	7.55	7.55	7.55	6.89	7.22	6.89	6.56	6.88	4.94	4.30	4.29	5.57	4.94	4.62							
23 Dmagnetus_M35_T568	3.04	3.98	4.60	4.60	2.42	2.73	1.20	3.67	3.67	3.67	3.04	3.36	3.04	2.73	3.04	2.42	1.20	2.42	3.03	2.74	2.73	4.94						
24 Pristocera_sp_1_Carr	5.58	4.93	5.92	5.92	3.97	4.29	4.29	6.22	6.22	6.22	5.58	5.25	4.93	5.25	5.57	4.61	4.29	3.04	4.97	4.93	3.35	7.55	5.58					
25 Pristocera_sp_d68	5.56	4.93	6.56	6.56	4.61	4.93	4.92	6.20	6.20	6.20	5.56	5.24	4.91	5.24	5.55	5.24	4.92	3.65	5.60	6.21	3.97	8.20	6.21	2.11				
26 Protisobranchium_M22	8.21	6.85	8.85	8.85	6.86	6.53	7.52	8.88	8.88	8.88	8.21	7.20	7.53	7.87	7.89	6.52	7.52	6.20	7.20	5.88	6.53	9.53	8.21	7.52	8.54			
27 Pseudisobranchium_A	4.60	4.60	5.58	5.58	3.97	4.28	3.97	5.24	5.24	5.24	4.60	4.28	3.97	4.28	4.60	4.28	3.97	2.72	4.64	5.24	3.03	6.89	5.24	3.35	2.72	7.20		
28 Pseudisobranchium_sp_Carr	5.24	4.28	4.93	4.93	3.34	3.65	3.97	5.89	5.89	5.89	5.24	4.92	4.60	4.92	5.24	3.65	3.97	2.72	3.99	4.60	3.03	6.53	5.24	3.35	3.97	7.18	3.03	
29 Trichiscus_sp_Carr	3.98	3.35	4.62	4.62	2.73	3.04	2.73	4.62	4.62	4.62	3.98	3.67	3.35	3.67	3.98	2.42	2.73	1.50	3.68	3.35	1.81	5.25	3.98	3.67	3.66	6.21	2.73	2.73

*Todas as posições que contêm *gaps* e dados faltantes foram eliminados. Houve um total de 353 posições na base de dados final.

Tabela 3: Estimativa de divergência evolutiva par-a-par entre sequencias de COI de *Dissomphalus* da Tailândia expressas em porcentagem.

Amostra		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	26	27	28
1	Femea_DOC48_T2185																												
2	Dchiangmaiensis_T3080	30.2																											
3	Dchiangmaiensis_T3104	29.2	5.0																										
4	Dthaianus_T1097	23.5	23.8	23.2																									
5	Dthaianus_T3665	23.5	23.8	22.4	13.6																								
6	Dthaianus_Viatna	21.0	23.8	23.8	7.8	13.3																							
7	Dwucheanus_T2810	25.3	26.5	23.2	23.8	21.2	21.8																						
8	Depitus_M01_T3428	20.2	25.6	25.9	21.2	20.7	19.3	19.9																					
9	Depitus_M01_T566	20.5	24.1	24.4	22.1	20.9	18.5	21.3	8.3																				
10	Dverus_M02_A11	3.0	30.2	28.9	23.2	23.5	20.7	23.0	19.3	20.2																			
11	Dprilus_M04_T2974	16.5	22.9	20.9	18.0	17.7	17.2	19.6	13.3	13.1	16.2																		
12	Ddaneus_M06_T3177	23.6	23.0	22.1	18.5	20.7	18.5	21.3	22.1	19.6	22.8	18.8																	
13	Ddaneus_M06_T3432	17.9	29.8	28.6	22.9	22.9	22.4	26.2	18.8	20.2	17.9	16.7	22.7																
14	Dgabus_M10_T2243	21.6	21.8	21.0	19.6	18.8	17.7	19.3	18.2	19.3	21.3	17.2	15.4	21.0															
15	Dgionus_M12_T1035	24.7	30.2	27.7	26.7	25.5	25.6	26.8	23.0	23.8	24.4	21.3	26.8	25.3	24.4														
16	Ddavus_M16_T121	22.4	24.4	23.3	22.1	22.4	20.4	21.8	20.7	20.1	22.4	19.6	19.1	26.7	16.1	23.5													
17	Ddavus_M16_T56	22.4	24.4	23.3	22.1	22.4	20.4	21.8	20.7	20.1	22.4	19.6	19.1	26.7	16.1	23.5	0.0												
18	Dzethus_M18_T106	25.3	27.0	25.8	19.8	22.1	18.0	24.2	20.4	19.8	25.3	18.2	20.4	24.1	22.4	25.6	24.4	24.4											
19	Djulus_M21_T202	26.8	26.7	26.4	25.6	23.8	23.2	27.3	25.6	25.9	28.1	20.4	25.0	24.2	21.2	28.9	25.0	25.0	24.7										
20	Djubus_M24_1097	27.1	28.9	28.3	27.4	25.8	25.1	29.3	27.7	27.7	27.1	23.6	25.9	29.2	24.7	25.0	25.0	25.0	28.9	28.2									
21	Djubus_M24_1102	27.1	29.2	28.6	27.4	25.8	25.1	29.6	27.7	27.7	27.1	23.6	25.6	29.2	24.4	25.0	24.7	24.7	28.9	28.2	0.2								
22	Dturinus_M27_T2810_1	22.7	23.9	22.1	24.7	19.8	20.9	18.5	22.4	19.3	23.3	20.4	19.7	24.1	15.1	25.6	17.4	17.4	25.9	23.2	30.3	30.3							
23	Dturinus_M27_T2810_2	23.0	23.6	21.8	25.0	19.6	21.2	18.8	22.7	19.6	23.6	20.7	20.0	24.4	14.9	25.3	17.7	17.7	26.2	23.5	30.0	30.0	0.2						
24	Dpaulus_M30_T1020	29.3	25.3	24.1	19.9	22.1	20.5	20.2	25.0	24.7	29.0	22.9	20.7	24.1	18.2	27.4	23.6	23.6	25.0	25.3	29.0	29.3	20.2	19.9					
25	Dbarbus_M31_T428	28.1	28.9	27.3	17.5	18.5	16.7	25.9	25.3	24.1	27.7	20.4	21.8	26.2	22.4	29.8	24.1	24.1	22.1	26.8	27.6	27.9	25.8	26.1	22.6				
26	Dmagnetus_M35_T568	23.6	23.0	22.1	18.5	20.7	18.5	21.3	22.1	19.6	22.8	18.8	0.0	22.7	15.4	26.8	19.1	19.1	20.4	25.0	25.9	25.6	19.7	20.0	20.7	21.8			
27	Dlidinus_M37_T2812_1	24.8	26.8	27.1	25.0	26.2	25.3	26.8	25.3	26.0	24.8	22.5	27.8	25.9	25.7	24.9	25.0	25.0	28.1	29.0	23.1	23.4	25.1	25.4	28.3	27.1	27.8		
28	Dlidinus_M37_T2812_2	24.8	26.8	27.1	25.0	26.2	25.3	26.8	25.3	26.0	24.8	22.5	27.8	25.9	25.7	24.9	25.0	25.0	28.1	29.0	23.1	23.4	25.1	25.4	28.3	27.1	27.8	0.0	
29	Pseudisobranchium_A	35.3	40.3	37.4	37.0	36.7	33.6	37.5	36.0	35.3	34.3	34.6	37.0	37.7	33.3	36.1	34.6	34.6	36.3	42.4	41.3	40.9	39.2	39.5	38.2	37.4	37.0	41.0	41.0

*Todas as posições que contêm *gaps* e dados faltantes foram eliminados. Houve um total de 476 posições na base de dados final

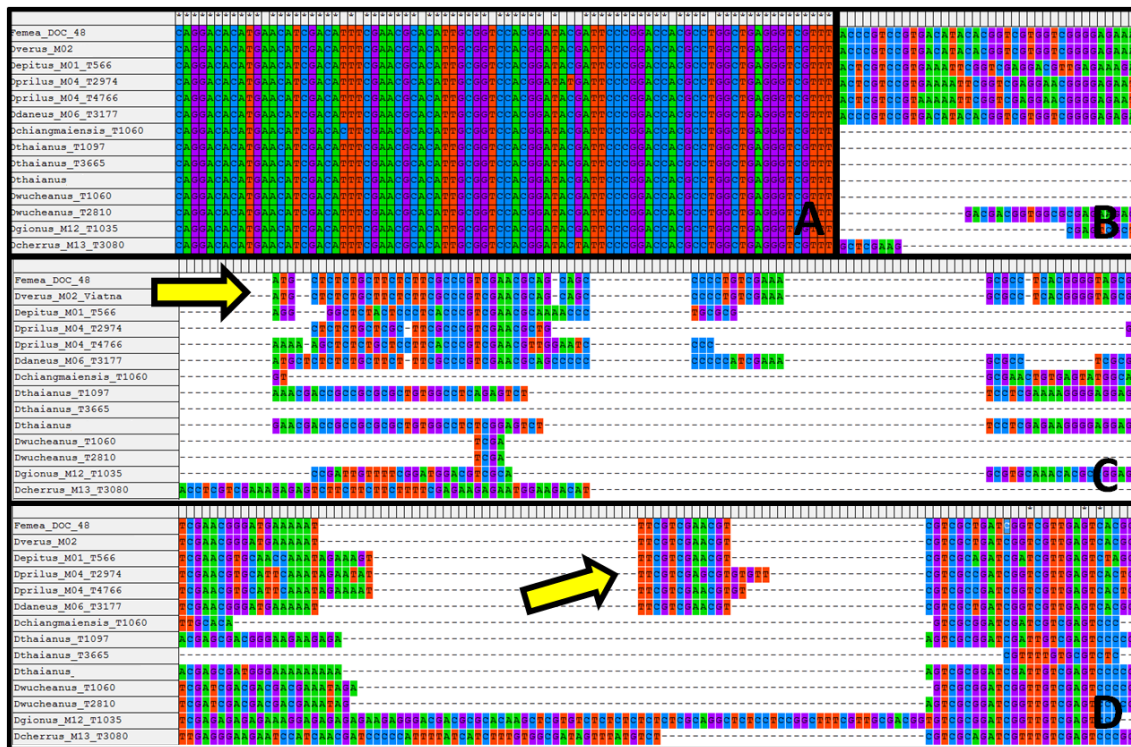


Figura 27: Padrões de alinhamento de ITS2 em *Dissomphalus*. A) Aproximadamente os 100 primeiros pares de base de ITS2 homólogos ao 5.8S de outros Hymenoptera e bastante conservado em *Disomphalus*. B) Bloco de *indels* comparável apenas no grupo de espécie formado pela fêmea e *D. verus*. C) Mesmo padrão de *indels* compartilhados entre a fêmea e *D. verus* (seta amarela). D) Blocos de homologia entre as sequências intercalados com *indels*.

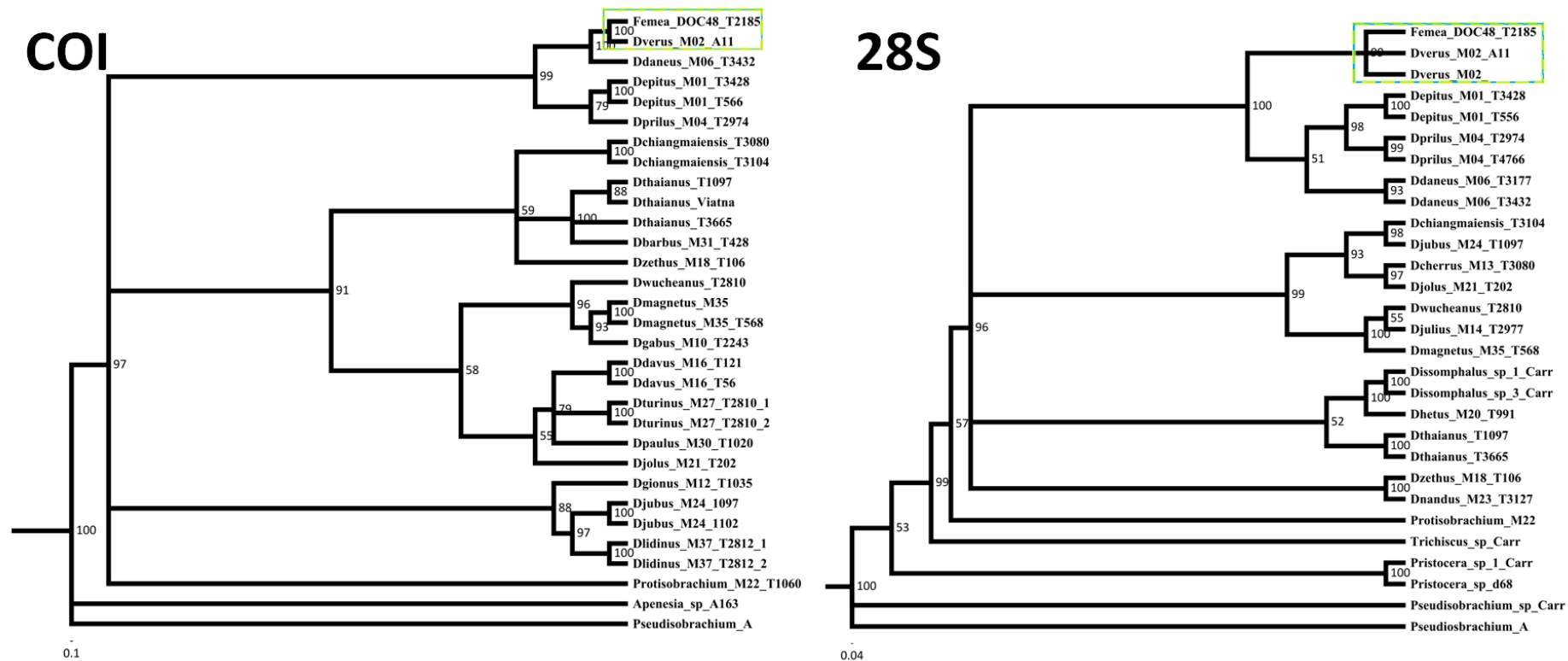
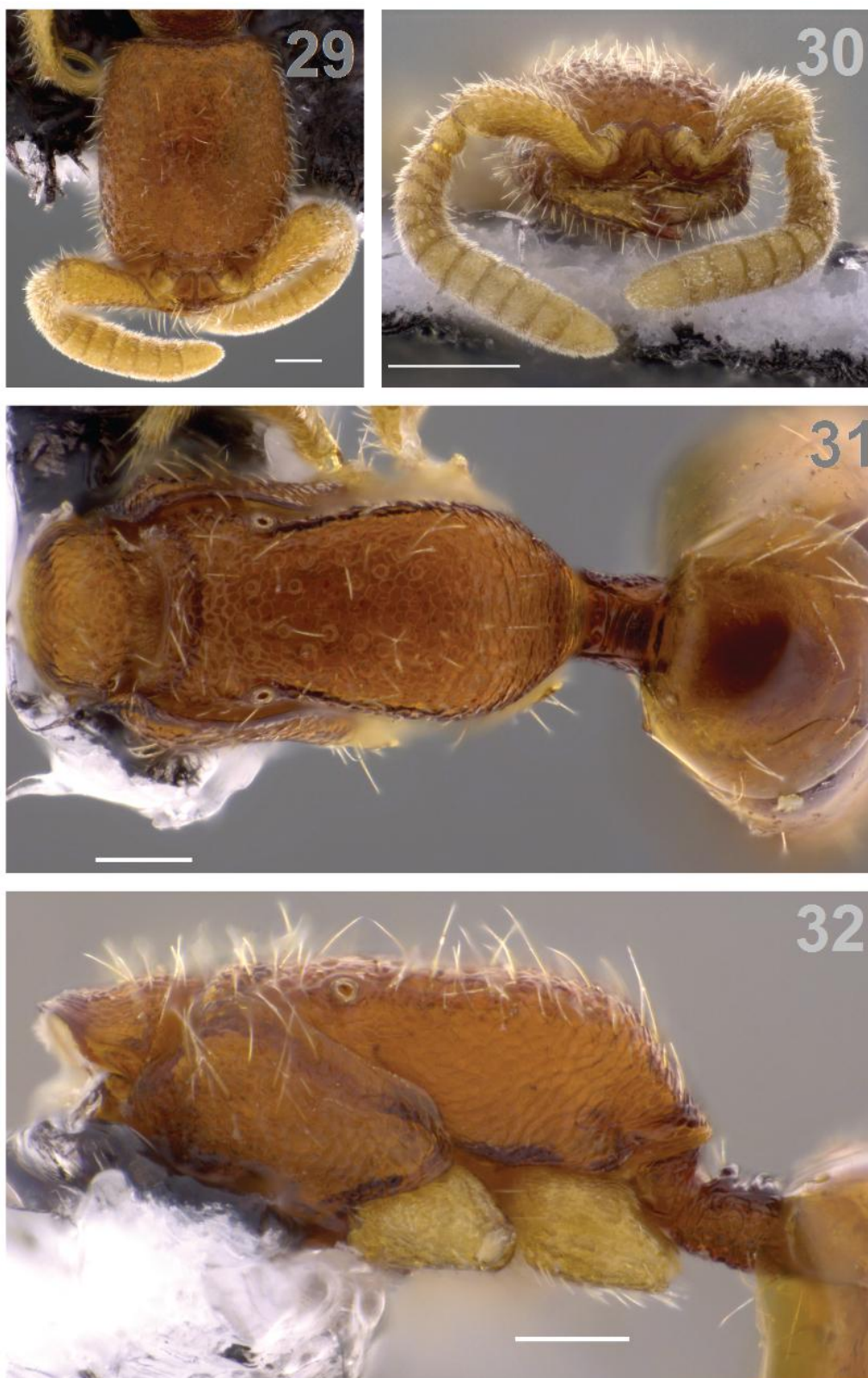


Figura 28 – Inferências filogenéticas bayesianas de COI (esquerda) e 28S (direita) dos *Dissomphalus* da Tailândia. Os números próximos a nós se referem a probabilidade posterior. Destaca-se no quadrado verde o posicionamento da fêmea pertencendo ao mesmo grupo monofilético que *D. verus*.



Prancha 3

Figuras 29-32: *Dissomphalus verus*, fêmea. 29, cabeça em vista dorsal. 30, cabeça em vista frontal. 31, mesossoma em vista dorsal. 32, mesossoma em vista lateral. (escala 200 μ M)

CAPÍTULO 3

Testando o monofiletismo de *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium* (Hymenoptera, Bethylidae) usando marcadores moleculares

3.1. Introdução

Dissomphalus Ashmead, *Trichiscus* Benoit e *Protisobrachium* Benoit são gêneros de Pristocerinae (Hymenoptera, Bethylidae). *Dissomphalus* foi o primeiro desses três gêneros a ser descrito (Ashmead 1893). Apresenta 242 espécies organizadas em 25 grupos, apesar de existir espécies sem grupo definido (Azevedo 2003). *Dissomphalus* é considerado um gênero cosmopolita, encontrados em todas as regiões biogeográficas, exceto Antártica (Terayama 1996). Esse gênero pode ser diagnosticado a partir de caracteres de machos, sendo o principal caráter diagnóstico a presença de dois tubérculos pubescentes localizados no tergito II do metassomo, chamado de processo tergal (Azevedo 2003). Contudo, possuir processo tergal não é exclusivo de *Dissomphalus*.

Trichiscus apresenta uma estrutura similar, provavelmente homóloga, que também é chamada de processo tergal. Diferentemente de *Dissomphalus*, o processo tergal de *Trichiscus* está localizado no terceiro tergito metassomal ao invés do segundo.

Inicialmente, *Trichiscus* foi descrito como um subgênero de *Dissomphalus*, mas Benoit (1986) elevou-o a gênero devido exclusivamente à posição diferenciada do processo tergal, embora as demais características de *Trichiscus* sejam similares a *Dissomphalus*. As duas únicas espécies do gênero, *T. suzannae* Benoit e *T. wittei* Benoit são conhecidas apenas para o continente africano (Benoit 1956, 1957, 1986).

Terayama (1996) realizou um estudo cladístico de Pristocerinae analisando 17 gêneros e sugeriu que o processo tergal de *Dissomphalus*, além de diagnóstico, é uma sinapomorfia do gênero, sendo única característica a dar suporte ao seu monofiletismo. Recentemente, Carr *et al.* (2010) isolaram o marcador RNAr 28S e reforçaram que *Trichiscus* e *Dissomphalus* compartilham um ancestral comum exclusivo, embora só

tenham amostrado mais outros três gêneros de Pristocerinae: *Foenobethylus* Kieffer, *Pristocera* Klug e *Pseudisobrachium* Kieffer.

Estudos taxonômicos em *Dissomphalus* neotropicais de Azevedo (1999, 2000, 2001 e 2003) utilizaram caracteres da genitália masculina para descrever espécies de *Dissomphalus*. Esses estudos sugerem que caracteres da genitália são mais informativos para delimitações de espécies do que os presentes no processo tergal, ao contrário do que indicou Terayama (1996, 2003). Dentre os machos das espécies de *Dissomphalus*, *D. incomptus* Evans é um exemplo de espécie que não apresenta o processo tergal. Isto sugere que essa característica foi perdida durante a evolução. Assim, 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, uma forma de se evitar que os *Dissomphalus* sem processo tergal sejam identificados como *Apenesia* Westwood ou *Pseudisobrachium* (Azevedo 2003).

Contudo, investigando-se a genitália dos demais gêneros de Pristocerinae, observou-se que o edeago dividido em duas estruturas está presente também em *Trichiscus* e *Protisobrachium*. Essa característica não é identificada em nenhum outro Bethylidae de que se conhece a genitália.

Protisobrachium, inicialmente, era conhecido apenas para a República Democrática do Congo (antigo Zaire), África, apresentando as espécies *P. gracile* Benoit e *P. rwindicum* Benoit. Mais tarde, foi descrita a espécie *P. asianum* Terayama para região oriental, sendo o primeiro registro do gênero fora da África continental (Terayama 1995). *Protisobrachium* aparentemente não possui modificações metassomais que lembre ao processo tergal de *Dissomphalus* e *Trichiscus*.

Assim, levanta-se a hipótese de que *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium* formariam um clado dentre os Pristocerinae, amparados pela sinapomorfia “edeago dividido em duas estruturas distintas”, afinal há evidências de que características da genitália sejam mais informativas do que as do processo tergal.

A hipótese de que uma característica da genitália seria uma sinapomorfia de *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium* é conflitante com a história filogenética conhecida para esses táxons. Na filogenia de Terayama (1996), *Dissomphalus* formou um grupo monofilético com *Trichiscus*, *Protisobrachium*, *Pseudisobrachium* e *Neoapenesia* Terayama, sendo *Dissomphalus* e *Trichiscus* grupo-irmão do clado formado por *Pseudisobrachium*, *Protisobrachium* e *Neoapenesia* Terayama. Esse

panorama filogenético sugere que a genitália dividida em duas parece ter surgido mais de uma vez em Pristocerinae. No entanto, atualmente têm sido utilizados marcadores moleculares associados a dados morfológicos para corroborar ou refutar a taxonomia de grupos tradicionais (Zaldívar-Riverón *et al.* 2008) e traçar evolução de caracteres morfoestruturais em Hymenoptera (Niehuis *et al.* 2003, Sarnat & Moreau 2011). Assim, o presente estudo pretende inferir filogenias moleculares e testar se a característica edeago dividido em duas estruturas é uma sinapomorfia de *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium*.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Material biológico: Foram selecionados 204 exemplares de *Dissomphalus*, 27 de *Protisobrachium* e oito de *Trichiscus* identificados em espécie quando possível para estudos moleculares, dessas 174 amostras (73%) estavam montadas na coleção a seco. Todas as amostras estão disponibilizadas na Coleção Entomológica da UFES. Para complementar o grupo interno Pristocerinae, foram selecionados pelo menos cinco exemplares dos gêneros *Pseudisobrachium* Kieffer, *Apenesia* Westwood, *Caloapenesia* Terayama, *Pristocera* Klung, *Foenobethylus* Kieffer e *Parascleroderma* Kieffer, além das sequências de RNAr 28S dos Pristocerinae isolados por Carr *et al.* (2010). Como grupo externo, foi selecionado *Sierola* Cameron (Bethylinae).

3.2.2. Extração e amplificação de DNA: O DNA foi extraído da musculatura da genitália e/ou dos últimos tergitos do metassomo de exemplares secos montados em alfinetes ou fixados mantidos em solução de etanol 100% utilizando-se *kit* de extração NUCLEOSPIN[®] (Macherey-Nagel) seguindo-se o protocolo do fabricante, com modificações (vide Capítulo 1).

Foi utilizado o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI), um dos mais utilizados em animais como marcador do código de barras de DNA (Hebert *et al.* 2003), além dos segmentos nucleares do gene nuclear do RNA ribossomal 28S (RNAr 28S) que recuperou filogenias consistentes de Bethylinidae (Carr *et al.* 2010).

A amplificação dos fragmentos de COI e RNAr 28S foi feita utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), em um volume final de 25 µl, com 2-4 µl de DNA molde no termociclador ABI Veriti[®].

Para amplificar o gene COI, foram utilizados os *primers* HCO2198 (5'-TAAACT TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') e LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGA TATTGG-3'), específicos para os 650 pb iniciais do gene (Folmer *et al.* 1994). As misturas de PCR continham 1x de solução tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada *primer* e 1 U 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°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 10 minutos.

Para o gene 28S, foram utilizados os *primers* F2 (5'-AGAGAGAGTTCAAGAG TACGTG-3') e D3 (5'-TAGTTCACCATCTTTCGGGTC-3') específicos para a região hipervariável D2-D3 do RNAr 28S (Carr *et al.* 2010). As misturas de PCR continham 1x de tampão da Taq, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada *primer* e 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 95° C por 60 segundos; (2) 40 ciclos de 95° C por 60 segundos (desnaturação), 50-52° C por 60 segundos (anelamento), 72° C por 90 segundos (elongação); (3) um período de final a 72° C por 10 minutos.

O sucesso da amplificação foi verificado utilizando-se 2 µl do produto de PCR misturados com 2 µl de BlueJuice® (Invitrogen, EUA) submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2,0 % a 100 V por 35 minutos. Foi utilizado o corante intercalante de DNA GelRed® (Biotium) e visualizado sob incidência de luz ultravioleta em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch® (Loccus). Todas as PCR foram feitas acrescentando água Mili-Q como controle negativo em sala isolada (pré-PCR) e as misturas de PCR foram realizadas em uma capela previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 10% e álcool 70%, onde nenhum DNA é manipulado. Para as reações que não geraram um produto de PCR, foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando-se como DNA molde 1,0 µL do produto de PCR da primeira reação, reduzindo-se os ciclos da PCR para 35, evitando-se bandas inespecíficas.

3.2.3. Purificação e Sequenciamento do DNA: Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação ExoSAP-IT® (USB Corporation) seguindo-se o protocolo do fabricante. Esse método de purificação utiliza duas enzimas hidrolíticas, Exonuclease I e Shrimp Alkaline fosfatase que em uma solução tampão, degradam restos de *primers* e dNTPs, respectivamente. Para isso, adicionou-se a 20 µl

do produto de PCR uma alíquota de 2 µl de ExoSAP-IT® diluídos 1:4. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em um espectrofotômetro NanoDrop® e também utilizando-se o marcador de peso molecular Lowmass® (Invitrogen). As sequências foram geradas a partir de um produto de PCR na empresa Macrogen Korea (<http://dna.macrogen.com>)

Foi gerada a sequência da fita senso de DNA utilizando-se somente os *primers* LCO1490 e F2, mas quando necessário, a fita antissenso foi utilizada para confirmar as ambiguidades. A identidade das sequências foram confirmadas através do método BLAST (Altschul 1997) que compara as sequências geradas com as disponíveis no *GenBank*.

3.2.4. Inferências filogenéticas: As sequências do COI foram alinhadas no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) auxiliado pelo ClustalX (Thompson *et al.* 1994) e conferidas visualmente. No caso de COI, utilizou-se a estrutura primária da proteína como referencial para o alinhamento. As sequências de RNAr 28S foram alinhadas com o auxílio do programa RNAsalsa (Stocsits *et al.* 2009) seguindo-se o protocolo padrão do programa. Utilizou-se como referência a estrutura secundária de RNAr 28S homóloga de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) inclusas no pacote do programa.

Foram geradas duas matrizes para as análises. A primeira apenas com as sequências alinhadas do COI e a segunda com as RNAr 28S. Utilizaram-se sequências de Bethyridae disponíveis no *GenBank* para compor a matriz final de RNAr 28S indicadas na tabela 4.

A etapa de inferência filogenética foi precedida pela verificação do grau de saturação das sequências no programa DAMBE 5.0.23 (Xia & Xie 2001) através do teste de Xia *et al.* (2003). Além disso, foi utilizado o programa jModelTest 0.1 (Posada 2008) para determinar o modelo evolutivo mais adequado a ser utilizado nas análises, selecionado pelo critério de informação Bayesiano (Schwarz 1978).

As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando-se o critério de otimização de máxima verossimilhança (ML), além da inferência Bayesiano (BS). As árvores de ML foram inferidas no programa PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel 2003) na qual a confiabilidade dos clados foram estimados em 1000 replicações de *bootstrap* (Felsenstain 1985). Somente valores de confiabilidade superiores a 50 foram considerados. As árvores de BS foram inferidas no programa Mr.Bayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) correndo-se duas cadeias de 20 milhões de gerações se

assegurando que o desvio padrão médio das frequências ficaram abaixo de 0,01 e *burnin* de 25%. Somente foram considerados grupos monofiléticos os que apresentaram probabilidade posterior superior a 95. A visualização e editoração das árvores filogenéticas foi realizada no programa FigTree v1.0.4.

Foram assinalados nas árvores filogenéticas os grupos que apresentam o edeago dividido em dois, de modo a verificar se essa característica surgiu apenas uma vez. Caso confirmado, a característica será apontada como uma sinapomorfia.

3.3. Resultados

3.3.1 Amostragem

Dos 256 espécimes de Bethyidae selecionados, 125 (49%) amplificaram eficientemente pelo menos um dos dois marcadores moleculares usados no estudo (Tabela 4). Observou-se dificuldades em amplificar DNA de amostras secas, sendo o sucesso foi maior de amostras da Tailândia, África continental e Comores conservadas em álcool.

Surpreendentemente, foi amplificado um mesmo haplótipo de COI em 17 amostras da África continental e Comores conservadas em álcool apresentando 100% de similaridade *Wolbachia sp.*, uma bactéria endossimbionte de himenópteros. Apesar disso, 12 dessas 17 amostras tiveram sequências de RNAr 28S isoladas sem qualquer contaminação, uma vez que não há o RNAr 28S em bactérias.

Foram amplificados DNA de três exemplares da África em via líquida cujo posicionamento do processo tergal é diferente do encontrado em *Trichiscus*, embora localizado no terceiro tergito (Figura 33). Observou-se que esses exemplares apresentam o edeago dividido em duas estruturas distintas. Eles não foram tratados como *Dissomphalus* ou *Trichiscus*, uma vez que a mudança de posição do processo tergal é uma característica que tradicionalmente distinguir gêneros em Pristocerinae. Assim, essas amostras serão referenciadas no presente estudo como “*Gênero Indeterminado*”, doravante tratado como *Gen. Indet.*

Isolou-se RNAr 28S e/ou COI de cinco *Dissomphalus* da África com processo tergal típico encontrado nas espécies da Tailândia *D. epitus* Mugrabi & Azevedo, *D. prilus* Mugrabi & Azevedo, *D. verus* Mugrabi & Azevedo e *D. daneus* Mugrabi & Azevedo.

Nas amostras do Madagascar foram isolados marcadores moleculares de três exemplares de *Protisobrachium* que pela primeira vez são registrados para a região. Dessas amostras, um apresenta características de um *Protisobrachium* típico (A76) enquanto os outros dois se assemelham com *Protisobrachium* da Tailândia que podem ser considerados atípicos devido a características da genitália e hipopígio que lembram *Dissomphalus*.

Na amostragem dos Emirados Árabes, foi encontrada apenas a espécie *D. gionus* Mugrabi & Azevedo, sendo o primeiro registro dessa espécie fora da Tailândia. Isolou-se pelo menos um dos marcadores de sete exemplares.

3.3.2. Matrizes de dados

As sequências de COI após alinhamento geraram uma matriz de 648 pares de base (pb), sem saturação em nenhuma das posições de códon (índice de saturação de sequências menor que o valor crítico, $ISS < ISS.C$). A matriz foi composta de 82 táxons terminais, desses 52 *Dissomphalus*, dois *Trichiscus*, 15 *Protisobrachium*, três *Apenesia*, dois *Caloapenesia*, dois *Pristocera*, dois *Pseudisobrachium* e um exemplar do *Gen. Indet.* representando o grupo interno Pristocerinae, além de dois *Sierola* Cameron (Bethylinae) como grupo externo. Foram observadas mutações do tipo *indel*, com presença/deleção de 1 a 3 trincas de nucleotídeos que foram marcadores para alguns gêneros: um bloco de 6 nucleotídeos em *Pseudisobrachium*, duas trincas de nucleotídeos em *D. nandus* Mugrabi & Azevedo e de uma trinca de nucleotídeos em *D. wusheanus* Terayama e *Caloapenesia*, correspondentes a um ou dois aminoácidos. Todos esses *indels* foram encontrados em porções distintas do fragmento. Diferentemente, observou-se que os 17 espécimes de *Dissomphalus* neotropicais compartilham um *indel* de três nucleotídeos em uma mesma posição do alinhamento.

O alinhamento das sequências de RNAr 28S revelou um número grande de *indels* intercalados por blocos grandes de homologies, padrão típico de alinhamento de sequências ribossomais. O tamanho das sequências amplificadas ficaram em torno dos 700 pb, exceto para um exemplar de *Dissomphalus sp.* de Madagascar (A70) que apresentou inserções variadas alcançando um tamanho amplificado com quase 900 pb.

As matriz final de RNAr 28S apresentou 1050 caracteres de 81 táxons terminais, sendo 56 *Dissomphalus*, sete *Trichiscus*, dois *Protisobrachium*, um *Apenesia*, dois *Parascleroderma* Kieffer, cinco *Pristocera*, dois *Pseudisobrachium*, três *Foenobethylus* Kieffer e três exemplares do *Gen. Indet.* representando o grupo interno Pristocerinae,

além de dois *Sierola* (Bethylinae) como grupo externo. Segundo o manual do RNAsalsa, testes por tentativa e erro são necessários para se estimar os parâmetros mais adequados para um conjunto de dados. Nesse caso, o alinhamento na qual foi usado para inferir as filogenias apresentou valores de 0.1 nas funções $-s1$, $-s2$ e $-s3$.

3.3.3. Inferências filogenéticas

O modelo evolutivo que melhor se adequou as análises foi o GTR+I+G na inferência de COI e o GTR+G em RNAr 28S. As filogenias obtidas tanto de ML quanto de BS mostraram topologias similares para Pristocerinae. Devido a similaridade, optou-se em mostrar apenas as árvores inferidas por BS tanto de RNAr 28S (Figura 34) quanto de COI (Figura 35).

Pristocerinae foram recuperados como um grupo monofilético com suporte maior que 95 em todas as análises. As topologias de árvores obtidas com COI e RNAr 28S revelam que *Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium* e o *Gen. Indet.* compartilham um ancestral comum único e exclusivo, com suporte de 96 e 99 em BS e 76 e 85 em ML para COI e RNAr 28S, respectivamente.

É possível observar na filogenia de COI que *Apenesia* e *Pristocera* são grupos-irmãos do clado formado por *Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium* e o *Gen. Indet.* com probabilidade posterior de 97 em BS e 77 de *bootstrap* em ML. No entanto, essa relação não foi recuperada com os dados de RNAr 28S, apresentando-se como uma politomia.

Para todos os marcadores e análises, *Trichiscus* e o *Gen. Indet.* são grupos distintos, cada qual monofilético com suporte maior que 98 em COI e RNAr 28S, nos casos em que mais de um indivíduo foi amplificado. Diferentemente, *Dissomphalus* e *Protisobrachium* foram recuperados como grupo polifilético em COI, uma vez que o clado dos *Protisobrachium* atípicos é grupo-irmão de alguns espécimes de *Dissomphalus* da Tailândia.

Na filogenia obtida a partir do RNAr 28S, *Dissomphalus* foi recuperado como grupo monofilético, quer seja na BS (100) quer seja na ML (95) se desconsiderado um *Dissomphalus* sem processo tergal (A116) que tende a se agrupar com o *Gen. Indet.* apesar do suporte baixo, sendo 60 em ML e 69 em BS. Ressalta-se que na filogenia de RNAr 28S não foram isoladas sequências dos *Protisobrachium* atípicos.

Nas análises com RNAr 28S, observa-se que no clado de *Trichiscus* as duas espécies do gênero, *T. wittei* e *T. suzannae*, são monofiléticas com probabilidade posterior 100. A sequência de *Trichiscus* sp. obtida do *GenBank* enraíza o grupo.

Nas análises com COI, verifica-se que no clado formado pelos *Protisobrachium* típicos, os espécimes africanos desse gênero são grupo-irmão do clado formado por amostras de Madagascar e Tailândia, todos com probabilidade posterior 100.

Entre os *Dissomphalus*, não foi possível estabelecer a relação de ancestralidade entre as linhagens encontradas, mas se observam algumas tendências. Na filogenia de RNAr 28S, as amostras neotropicais compartilham ancestral comum com amostras da África continental, Comores e Madagascar. No COI, as espécies neotropicais mostraram-se monofiléticas e próximas de um agrupamento que inclui representantes de táxons da Tailândia e África.

De modo geral, táxons terminais coletados na Tailândia se encontram dispersos entre as linhagens observadas tanto no COI quanto no RNAr 28S. Destaca-se um grupo de espécies formado por *D. epitus*, *D. verus*, *D. prilus* e *D. daneus*, com representatividade em COI e RNAr 28S, que são filogeneticamente próximos com *Dissomphalus* da África e compartilham semelhanças morfológicas (vide capítulo 2) de modo a indicar um grupo de espécies. Na filogenia obtida a partir de RNAr 28S, a relação entre os espécies desse grupo são recuperados com melhor suporte, sugerindo que os espécies da África são grupo-irmão das espécies da Tailândia, com probabilidade posterior em BS de 100.

Em relação aos *Dissomphalus* sem o processo tergal (*D. turinus* Mugrabi & Azevedo e *D. lidinus* Mugrabi & Azevedo), eles estão dispersos entre os demais *Dissomphalus* com processo, sugerindo que o processo tergal foi perdido durante a evolução de algumas linhagens.

3.4. Discussão

3.4.1. Monofiletismo de *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium*

As inferências filogenéticas do presente estudo sugerem que *Dissomphalus*, *Trichiscus* e *Protisobrachium* compartilham um ancestral comum exclusivo. No entanto, as filogenias moleculares do presente estudo são discordantes da c filogenia baseada em dados morfológicos de Terayama (1996).

As análises cladísticas de Terayama (1996) recuperaram uma filogenia na qual *Dissomphalus* e *Trichiscus* compartilham um ancestral comum, grupo-irmão do clado formado por *Pseudisobrachium*, *Protisobrachium* e *Neoapenesia*. A presença do processo tergal foi apontada como única sinapomorfia de *Dissomphalus*, enquanto que sua localização no terceiro tergito foi uma das sinapomorfias de *Trichiscus*. Sem processo tergal, *Pseudisobrachium*, *Protisobrachium* e *Neoapenesia* foram agrupados por características do mesossomo, em especial a ausência dos notáulices.

No presente estudo, *Dissomphalus* e *Trichiscus* não são recuperados como grupo-irmão nas filogenias obtidas com o COI e RNAr 28S, diferente de Terayama (1996) e Carr *et al.* (2010). Além disso, *Pseudisobrachium* e *Protisobrachium* são sempre recuperados em clados distintos, um arranjo filogenético diferente do encontrado por Terayama (1996).

A escolha inadequada de caracteres, tanto em estudos moleculares quanto nos morfológicos, pode levar a inferências filogenéticas que não refletem a história evolutiva dos táxons. Uma vez reveladas incongruências entre sinais filogenéticos de dados moleculares e morfológicos, entender o porquê dos sinais serem divergentes aumenta a confiabilidade de um dado em relação ao outro (Carpenter & Wheeler 1999).

O estudo cladístico de Terayama (1996) utilizou 17 dos 22 gêneros válidos de *Pristocerinae* para a época. Além disso, foram incluídos tipos de muitas espécies para representar a diversidade dos gêneros. Para o presente estudo, foram geradas sequências de pelo menos um dos dois genes (COI e 28S) de nove gêneros de *Pristocerinae* (*Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium*, *Pseudisobrachium*, *Apenesia*, *Caloapenesia*, *Pristocera*, *Foenobethylus* e *Parascleroderma*) dentre os quais incluem representantes dos gêneros mais especiosos e abundantes do grupo. No estudo de Terayama (1996), além dos gêneros aqui utilizados, outros nove fizeram parte da análise cladística (*Afgoiogfa* Argaman, *Acrepyris* Kieffer, *Afrocera* Benoit, *Prosapenesia* Kieffer, *Neoapenesia*, *Dicrogenium* Stadelmann, *Neodicrogenium* Benoit, *Diepyris* Benoit, *Kathepyris* Kieffer). Quatro desses gêneros (*Dicrogenium*, *Neodicrogenium*, *Diepyris* e *Kathepyris*) serão sinonimizados em *Pristocera* por Zamprognó & Azevedo (*in press*) enquanto os demais são gêneros raros, conhecidos por poucas espécies e restritos a determinadas regiões.

A raridade das espécies muitas vezes inviabiliza a obtenção da representatividade dos táxons para os estudos moleculares. Assim, o estudo filogenético de Terayama e do presente estudo possuem uma amostragem representativa de

Pristocerinae. No entanto, o estudo de Carr *et al.* (2010) avaliaram poucos táxons de Pristocerinae, o que pode ter influenciado na recuperação de *Trichiscus* e *Dissomphalus* como grupo-irmão. Nossos dados revelam que ambos são monofiléticos, e incluem *Protisobrachium*, gênero que não foi amostrado por Carr *et al.* (2010).

Apesar disso, pode-se apontar alguns aspectos metodológicos que podem ter influenciado na obtenção das filogenias de Terayama (1996). De modo geral, os espécies utilizados para representar os gêneros foram amostrados das regiões biogeográficas Oriental e Afrotropical. Esse fato pode ter ocultado parte da identidade dos gêneros e revelado como características genéricas aquelas exclusivas de táxons da região. Por exemplo, o fato das notáulices serem ausentes ou obsoletas foi apontado como sinapomorfia de *Pseudisobrachium*, *Protisobrachium* e *Neoapenesia* (Terayama 1996). Entretanto, se espécies de *Pseudisobrachium* da região Neotropical houvessem sido representativos no estudo de Terayama, provavelmente a ausência das notáulices não seria codificada como uma característica de *Pseudisobrachium*, uma vez que há muitas espécies neotropicais desse gênero que as notáulices são presentes.

Observa-se também na análise de Terayama (1996) que foram utilizados como táxons terminais os gêneros ao invés dos espécies. Isso implica que os gêneros sempre serão monofiléticos, o que elimina as chances de que as espécies que compoem um gênero se comportem como grupos merofiléticos, como foi observado em *Protisobrachium* no presente estudo. Afinal, reduzir a identidade do gênero a um táxon terminal desconsidera a variação de estados de caráter existentes entre os espécimes que representam os gêneros. No estudo de Terayama (1996), dos 49 caracteres analisados, 27 são informativos para a parcimônia e 22 são autapomorfias, talvez um reflexo de utilização de caracteres diagnósticos de gêneros para compor a matriz de dados. Outro fator foi a polarização dos caracteres utilizando um único grupo externo hipotético ao qual foi atribuído o estado plesiomórfico para todos os caracteres. Dessa forma, propõe-se que a filogenia de Terayama (1996) pode estar influenciada por muitos aspectos metodológicos mais do que pela identidade e história evolutiva dos gêneros.

De modo geral, uma das maiores dificuldades da cladística é o estabelecimento das homologias de caracteres, principalmente porque o cerne do método filogenético se baseia na utilização das homologias primárias para recuperar a história natural dos táxons. De modo similar, estabelecer homologias também é uma dificuldade de inferências filogenéticas moleculares. Contudo, nenhuma das sequências geradas no presente estudo apresenta indícios de que elas sejam parálogas, ou seja, de comparação

inapropriada para estudos filogenéticos moleculares. Ainda assim, pode-se questionar se as homologies foram estabelecidas adequadamente durante o alinhamento do RNAr 28S que apresentou muitos *indels*. É nesse sentido que a adoção de método de alinhamento que se utiliza da estrutura secundária do RNAr 28S pode reduzir a possibilidade de alinhamentos duvidosos (Stocsits *et al.* 2009), ainda mais utilizando-se de um Hymenoptera (*Apis mellifera* Linnaeus) como referência de estrutura secundária de RNAr 28S.

Talvez a seleção das características diagnósticas seja um dos fatores que mais contribuiu para a incongruência encontrada nos estudos de Terayama e no presente estudo. Afinal, uma única característica da genitália, que não foi avaliado no estudo de Terayama (1996), se apresenta como uma sinapomorfia de *Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium* e do *Gen. Indet.* em uma filogenia inferida exclusivamente por dados moleculares.

Assim, o arranjo observado na filogenia molecular é congruente com o sugerido apenas pela divisão edeago em dois, embora essa característica do edeago possa não ser a única a sugerir o arranjo filogenético encontrado. Aparentemente, caracteres da genitália aparentam ser fundamentais para recuperar a história natural de *Pristocerinae*. Com essa constatação, evidencia-se que a genitália masculina pode ser uma fonte de caracteres cujo uso não deve se restringir à descrição de espécies. Deve ser utilizado como fonte de caracteres de inferências filogenéticas.

De modo geral, há interpretações sugerindo que caracteres da genitália não sejam tão informativos para se inferir filogenias (Losos 1999, Eberhard 2004). Primeiro que a genitália masculina está sujeita a uma seleção sexual acentuada (Eberhard 2010) que pode haver perda de sinal filogenético em comparações entre táxons de categorias taxonômicas superiores a espécie. Afinal, caracteres submetidos à seleção sexual tendem a evoluir mais rápido (Gavrilets 2000) ao ponto que cada espécie nova tende a apresentar uma configuração de genitália diferente das espécies irmãs (Eberhard 1985). Assim, argumenta-se que caracteres da genitália tendem a apresentar muitas autapomorfias devido a sua natureza espécie-específica (Song & Bucheli 2010), o que do ponto de vista cladístico seria inapropriado, pelo fato de autapomorfias não serem informativas.

Apesar dessas suposições sobre caracteres da genitália, testes empíricos sugerem que a genitália apresenta mais sinapomorfias e menos homoplasias do que características encontradas fora da genitália (Song & Bucheli 2010). Ou seja, é possível

reduzir as chances de se codificar caracteres que venham a ser homoplasias a partir de caracteres da genitália.

No entanto, estabelecer homologias entre caracteres da genitália pode ser mais complicado do que qualquer outro caráter morfológico, uma vez que a genitália apresenta uma variedade fenotípica tão grande que muitas vezes elas aparentam ser incomparáveis. Contudo, no presente estudo foi possível inferir filogenias independentes de uma matriz morfológica de dados. Isso permitiu associar características morfológicas de comparação difícil e colocá-las nos clados inferidos por dados moleculares para apontar características compartilhadas exclusivamente por um grupo.

Similarmente a esse estudo, Sarnat & Moreau (2011) utilizaram sequências de genes mitocondriais e nucleares para testar se grupos de espécie de formigas insulares do gênero *Pheidole* Westwood que apresentam espinhos compartilham um ancestral comum com outros grupos continentais com espinho. No trabalho foi observado ao mapear a característica morfológica na filogenia molecular que os espinhos em *Pheidole* surgiram mais de uma vez. Linhagens monofiléticas restritas a algumas ilhas distintas do oceano Pacífico desenvolveram os espinhos. Essa constatação sugere evolução convergente dessa característica na qual o surgimento dos espinhos parece estar associado a adaptações a um determinado nicho ecológico similar disponível em cada uma das ilhas. Ou seja, a presença de espinhos em *Pheidole* é uma homoplasia, que tradicionalmente era usada para propor proximidades filogenéticas entre grupos de espécie de *Pheidole*.

No presente estudo, observa-se que a origem do edeago dividido em dois surgiu uma única vez na história do grupo, confirmando a hipótese inicial do trabalho que característica é uma sinapomorfia (Figuras 34 e 35).

Inicialmente, a característica de o edeago ser dividido em dois pode ser considerada uma apomorfia, uma vez que nos espécies usados no grupo externo, o edeago não é dividido. Assim, é possível observar que o monofiletismo de *Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium* e *Gen. Indet.*, pode ser amparado pela divisão do edeago em duas estruturas distintas (ramo ventral e corpo dorsal) cujo surgimento aparentemente é único. Essa é uma constatação sem o apoio de um estudo cladístico que utilize caracteres da genitália, mas com justificativas de se considerar o edeago dividido uma sinapomorfia. Afinal uma história filogenética foi recuperada com

dados moleculares na qual todos os gêneros de *Pristocerinae* com edeago dividido conhecido formam um grupo monofilético.

Portanto, os dados moleculares reforçam que a genitália é uma fonte de informações taxonômicas em *Pristocerinae* com potencial de se revelar relações de parentesco entre gêneros de forma tão informativa quanto os apresentados pelos dados moleculares.

3.4.2. *Dissomphalus* e *Protisobrachium*: gêneros polifiléticos?

Na filogenia de COI (Figura 35), observou-se que *Dissomphalus* e *Protisobrachium* são gêneros polifiléticos devido a presença de um clado formado por *Protisobrachium* atípicos, identificados como M26, dentre os *Dissomphalus*, embora o suporte de *Dissomphalus* tenha sido baixo.

Os *Protisobrachium* atípicos (M26), assim como todas as três espécies descritas para esse gênero, apresentam antenas, metassomo e mesossomo longos e delgados, notáulices ausentes e clipeo amplamente produzido anteriormente. No entanto, pela observação de características da genitália e hipopígio, estes espécimes compartilham características descritas como típicas para *Dissomphalus* (D. Mugarbi, com. pessoal), dentre as quais cita-se a haste mediana do hipopígio longa e formato retangular do edeago. Diferentemente, essas características de genitália e hipopígio não são observadas nos demais *Protisobrachium* do estudo.

De modo geral, os dados moleculares do COI corroboram que os *Protisobrachium* atípicos (M26) sejam *Dissomphalus*. Primeiro que o clado desses *Protisobrachium* atípicos compartilha ancestral comum com *D. turinus* Mugarbi & Azevedo, *D. jolus* Mugarbi & Azevedo e *D. davus* Mugarbi & Azevedo, para os quais não há dúvidas que sejam *Dissomphalus*. Vale ressaltar que tanto *Protisobrachium* atípicos quanto *D. turinus* não apresentam processo tergal. Ou seja, a perda do processo tergal aconteceu nessa linhagem. Assim, os *Protisobrachium* atípicos, representados pela M26, serão tratados como *Dissomphalus* nas discussões a seguir.

As definições morfológicas tradicionais de *Protisobrachium*, tais como o padrão corporal delgado e longo, são encontradas em duas linhagens moleculares distintas, o que inclui os *Protisobrachium* típicos e um grupo de *Dissomphalus* (M26), sugerindo uma evolução convergente desse padrão corporal. Observa-se que os exemplares desse padrão corporal foram coletados tanto na Tailândia quanto Madagascar. Ou seja, mesmo

de localidades similares, alguma pressão seletiva fez com que as linhagens convergissem a um mesmo padrão morfológico.

Sarnat & Moreau (2011) evidenciam uma convergência evolutiva que ocorreu em linhagens distintas de formigas do gênero *Pheidole*. Nesse trabalho, foi sugerido que em ilhas diferentes do Pacífico, porém que apresentavam condições ecológicas similares, os espinhos dessas formigas teriam surgido mais de uma vez em resposta às condições ecológicas específicas de forrageamento e à presença de predadores. Diante desse exemplo, seria razoável pensar que pressões ecológicas possam ter sido as responsáveis pela convergência evolutiva entre linhagens distintas de *Protisobrachium*. Ressalta-se que esses animais apresentam hábito de vida parasitóide e que, devido a essa característica biológica, a convergência evolutiva pode estar associada também a adaptação desses grupos a um tipo específico de hospedeiro. No entanto, não há informações específicas sobre quais grupos esses animais utilizam como hospedeiro.

A partir dos resultados aqui obtidos, ainda não seria possível indicar o monofiletismo de *Dissomphalus*, mesmo considerando *Protisobrachium* atípicos como sendo pertencentes ao gênero *Dissomphalus*. Isso se deve ao fato do exemplar A116, identificado como *Dissomphalus* sem processo tergal, tender a se agrupar com o *Gen. Indet.* na filogenia de RNAr 28S. Esse exemplar apresenta genitália com edeago dividido em corpo dorsal e ramo ventral, típico de *Dissomphalus* e, por outro lado, apresenta nuances de genitália similar as encontradas no *Gen. Indet.*, o que potencialmente faz desse espécime como pertencente ao *Gen. Indet.* Assim, sugere-se que na linhagem de *Gen. Indet.*, possam existir táxons que também perderam o processo tergal, fazendo com que A116 não seja um *Dissomphalus* sem processo tergal.

3.4.3. *Trichiscus* e *Protisobrachium* devem ser tratados como sinônimos de *Dissomphalus*?

Considerando que o edeago é uma sinapomorfia que agrupa os três gêneros (presente estudo), que *Dissomphalus* é delimitado pelo edeago (Azevedo 2003) e que essa característica não é exclusiva de *Dissomphalus*, questiona-se se *Trichiscus* e *Protisobrachium* poderiam ser considerados sinônimos juniores de *Dissomphalus*.

De modo geral, as categorias taxonômicas superiores a espécie são classificações arbitrárias (no senso de Simpson 1989) e por isso deve ser ponderado até que ponto qual ou quais caracteres que definem uma categoria superior (Winston 1999). Para uma avaliação de gênero, pode-se utilizar caracteres das espécies-tipo e menos

frequentemente caracteres que aparecem nos últimos passos de uma chave de identificação, como referências para selecionar os caracteres que resumem a identidade de gêneros. Basicamente para identidade de *Trichiscus* e *Dissomphalus* podem ser considerados o processo tergal e o edeago dividido em dois, enquanto que para *Protisobrachium* seja utilizado o clipeo fortemente produzido como uma característica potencial. Assim, serão associadas essas informações morfológicas com as filogenias moleculares.

As análises moleculares do presente estudo (Figura 35) corroboram que cada um dos três gêneros são monofiléticos, embora a relação entre eles não tenha sido estabelecida e considerando os *Protisobrachium* atípicos como *Dissomphalus*. Do ponto de vista morfológico, *Trichiscus* difere de *Dissomphalus* basicamente pela posição do processo tergal (Benoit 1957) no 3º e 2º tergito, respectivamente. No passado, *Trichiscus* era considerado um subgênero de *Dissomphalus* (Benoit 1956). Isso sugere que propor a sinonímia de *Trichiscus* com *Dissomphalus* não seria novidade se desconsiderado que a posição do processo tergal é um caráter que distinguiria gêneros de Bethyridae. Contudo, formalizar a sinonímia entre esses dois táxons implicaria na aceitação de que a posição do processo tergal não é suficiente para distinguir gêneros distintos.

É nesse contexto que se inserem os espécimes identificados como *Gen. Indet.* e *Protisobrachium*. Enquanto o primeiro apresenta processo tergal no 3º tergito em uma posição diferente de *Trichiscus* e *Dissomphalus*, o segundo não possui o processo tergal. Assim, para propor a sinonímia entre *Trichiscus* e *Dissomphalus*, seria necessário incluir pelo menos o *Gen. Indet.* em *Dissomphalus*, uma vez que ele também apresenta o processo tergal.

Observa-se na filogenia de COI (Figura 35) que *Gen. Indet.*, *Protisobrachium* e *Trichiscus* compartilham um ancestral comum, grupo-irmão de *Dissomphalus*, que devido ao suporte baixo do clado, é considerado polifilético na análise. Diferentemente, nas árvores de RNAr 28S (Figura 34), observa-se uma politomia basal entre *Dissomphalus*, *Trichiscus*, *Protisobrachium* e *Gen. Indet.* sendo que todos são reciprocamente monofiléticos. Assim os dados moleculares são concordantes ao indicar que esses quatro táxons apresentam identidades genéticas próprias.

Do ponto de vista morfológico, *Protisobrachium* se aproxima filogeneticamente a *Trichiscus* e *Dissomphalus* aparentemente apenas por características da genitália. Afinal, desconsiderando-se caracteres da genitália, eles são tão similares a

Pseudisobrachium que possivelmente esse foi um dos motivos de *Protisobrachium* ter sido recuperado em um mesmo clado de *Pseudisobrachium* na cladística de Terayama (1996). Assim, em princípio, os dados morfológicos tidos como de gêneros só seriam adequados para sustentar a sinonímia entre *Dissomphalus* e *Trichiscus* e a manutenção de *Protisobrachium*.

Considerando essa situação, seria possível redefinir *Protisobrachium* como um gênero de clipeo fortemente produzido, genitália dividida em duas, sem processo tergal, os diferenciando de outro gênero potencial formado por *Dissomphalus* e *Trichiscus*. Isso significa que se deve avaliar se a posição, forma e ausência de processo tergal distinguiriam gêneros distintos.

Estudos taxonômicos em *Dissomphalus* neotropicais de Azevedo (1999, 2000, 2001 e 2003) sugerem que a existência de *Dissomphalus* sem processo seria uma reversão de caráter durante a diversificação de algumas linhagens. As topologias obtidas no presente estudo corroboram que a perda do processo tergal tenha ocorrido mais de uma vez em *Dissomphalus* (reversão). Além disso, há espécies de *Dissomphalus* descritos que não apresentam o processo tergal. Ou seja, avaliar se o processo tergal surgiu uma única vez e ainda propor uma série de transformação das varias formas e posições do processo tergal, pode ser um recurso para subsidiar a distinção mais acurada de gêneros. Afinal, se a posição do processo tergal distingue *Dissomphalus* de *Trichiscus*, porque os *Dissomphalus* neotropicais que apresentam processo tergal classificado como mediano (processos tergais próximos entre si) não são considerados um gênero a parte de *Dissomphalus*?

Em princípio, os dados do presente estudo não permite inferir uma série de transformação do processo tergal, uma vez que não foi estabelecido qual dos gêneros com processo tergal é o mais antigo. Contudo, é mais parcimonioso que o processo tergal tenha surgido uma única vez, e tenha migrado do terceiro tergito para o segundo tergito (ou vice-versa), sendo o processo tergal encontrado em *Trichiscus* uma forma intermediária e o processo tergal mediano seja um outro passo de transformação.

Uma abordagem filogenética a partir de caracteres morfológicos e a adição de outros marcadores moleculares são necessárias para se inferir filogenias mais robustas para então verificar uma série de transformação do processo tergal. Isso permitirá avaliar a relação filogenética entre as linhagens de *Dissomphalus* e a elucidação de outras características sinapomórficas diferentes do edeago dividido.

Assim, até então, é mais prudente a manutenção dos gêneros *Trichiscus*, *Dissomphalus* e *Protisobrachium* e o abandono da definição de *Dissomphalus* como o gênero que apresenta o “edeago dividido em duas estruturas” até que seja elucidada se o processo tergal surgiu uma única vez, que sejam encontradas outras características morfológicas que possam ser adotadas como caracteres para diferenciar os gêneros além do edeago e processo tergal.

3.5. Referências

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.
- Ashmead WH (1893) Monograph of the North American Proctotrypidae. *Bulletin of the United States National Museum*, 45:1–472.
- Azevedo CO (1999) On Neartic *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae), with the description of two new species from Florida. *Iheringia*, 87:49-56.
- Azevedo CO (2000) The dumosus group of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae): definition and description of a new amazonian species. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 16:91-97.
- Azevedo CO (2001) Systematics of the Neotropical *Dissomphalus* Ashmead (Hymenoptera, Bethylidae) of the bicavatus group. *Revista Brasileira de Entomologia*, 45:173-205.
- Azevedo CO (2003) Synopsis of the Neotropical *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethylidae). *Zootaxa*, 338:1-74.
- Benoit PLG (1986) Bethylidae africains (Hymenoptera): V. le genre *Trichiscus*. *Revue de zoologie africaine*, 99:293-98.
- Benoit PLG (1956) Contributions a l'etude de la faune entomologique du Ruanda-Urundi. *Annalen van het Museum van Belgisch Congo*, 51:560-564.
- Benoit PLG (1957) Hymenoptera - Bethylidae. Exploration du Parc National Albert. Mission G. F. De Witte, 1933-1935. *Bruxelles: Institute des parcs nationaux du Congo belge*, 88:1-57.
- Carpenter JM, Wheeler WC (1999) Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta*, 28:251-260.
- Carr M, Young JPW, Mayhew PJ (2010) Phylogeny of bethylid wasps (Hymenoptera: Bethylidae) inferred from 28S and 16S rRNA genes. *Insect Systematics & Evolution*, 41:55–73.
- Eberhard, WG (1985) Sexual Selection and Animal Genitalia. Harvard University Press, Boston, MA, USA.
- Eberhard WG (2004) Male–female conflict and genitalia: failure to confirm predictions in insects and spiders. *Biological Reviews*, 79:121–186.

- Eberhard WG (2010) Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica*, 138:5–18.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:294-299.
- Gavrilets S (2000) Rapid evolution of reproductive barriers driven by sexual conflict. *Nature*, 403:886–889.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SI, Waard Jr (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270:313–321.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754-755.
- Losos, JB (1999). Uncertainty in the reconstruction of ancestral character states and limitations on the use of phylogenetic comparative methods. *Animal Behavior*, 58:1319–1324.
- Mugrabi D, Azevedo CO (2013) Review of *Dissomphalus* (Hymenoptera, Bethyridae) from Thailand. *Zootaxa*, in press.
- Niehuis O, Wagele JW (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.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25:1253-1256
- Sarnat EM, Moreau CS (2011) Biogeography and morphological evolution in a Pacific island ant radiation. *Molecular Ecology*, 20:114–130.
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6:461-464.
- Simpson GG (1989) *Princípios de Taxonomia Animal*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Song H, Bucheli SR (2010) The utility of insect genitalia in morphological analyses. *Cladistics*, 26:23-35.

- Stocsits RR, Letsch H, Hertel J, Misof B, Stadler PF (2009) Accurate and efficient reconstruction of deep phylogenies from structured RNAs. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkp600A.
- Terayama, M (2003) Phylogenetic Systematics of the family Bethylidae (Insecta: Hymenoptera) Part II. Keys to subfamilies, tribes and genera in the world. *Academic Reports Faculty of Engineering Tokyo Polytechnic University*, 26:16–29.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and 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 (1995) Caloapenesia and Neoapenesia, New Genera of the Family Bethylidae (Hymenoptera, Chrysoidea) from the Oriental Region, with Proposals of Two New Synonymies of Genera. *Japanese journal of entomology*, 63:881-891.
- Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673–4680.
- Winston JE (1999) *Describing Species: practical taxonomic procedure for biologists*. Columbia University Press, New York, 518p.
- 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.
- Xia X. & Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92:371-373.
- Zamprogno LN, Azevedo CO (2013) Phylogeny and reclassification of Pristocera Klug (Hymenoptera, Bethylidae). *Insects Systematics and Evolution*, *in press*.
- Zaldivar-Riveróna A, Belokobylskij AS, León-Regagnona V, Briceño R, Quicke DI (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan parasitic wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Invertebrate Systematics* 22:345–363.

3.6. Tabelas e figuras

Tabela 4: Relação dos exemplares em que pelo menos um dos marcadores foi sequenciado.

Identificação	Registro	COI	28S	P	Localidade
<i>Apenesia</i> sp.	A163	x		N	Madagascar
<i>Apenesia</i> sp.	DOC118	x	x	N	
<i>Apenesia</i> sp.	DOC131	x		N	
<i>Caloapenesia</i> sp.	A27	x		N	Tailândia
<i>Caloapenesia</i> sp.	A29	x		N	Tailândia
<i>Dissomphalus apertus</i>	DOC346	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus barbuis</i>	M31 T428	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus bicavatus</i> sp.nov1	DOC420	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus biceretus</i>	DOC353	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus cherrus</i>	M13 T3080		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus Chiangmaiensis</i>	T3080	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus Chiangmaiensis</i>	T3104	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus conicus</i>	DOC363	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus conicus</i> sp.nov1	DOC362	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus connubialis</i>	DOC356	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus curviventris</i>	DOC360	x	x	2	Brasil
<i>Dissomphalus cuviatus</i>	DOC428		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus daneus</i>	A7 M06 T3432	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus daneus</i>	M06 T3177	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus daneus</i>	M06 T4746		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus davus</i>	M16 T121	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus davus</i>	M16 T56	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus epitus</i>	A10 M01 T3428	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus epitus</i>	M01 A10		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus epitus</i>	M01 T566	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus gabus</i>	M10 T2243	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus gionus</i>	A101	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus gionus</i>	A103	x		2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	A105	x		2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	A106 M12	x		2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	A107	x		2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	A108	x	x	2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	A109	x	x	2	Emirados Árabes
<i>Dissomphalus gionus</i>	M12 T1035	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus gr conicus</i> sp.nov3	DOC364		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus gr conicus</i> sp.nov4	DOC361		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus gr microstictus</i> sp.nov1	DOC387		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus gr Tailândia</i>	A117 M89		x	2	Rep. Cen. Africana
<i>Dissomphalus gr Tailândia</i>	A121 KZN05		x	2	África do Sul
<i>Dissomphalus gr Tailândia</i>	A121 KZN08	x	x	2	África do Sul
<i>Dissomphalus gr Tailândia</i>	A125 KZN05		x	2	África do Sul
<i>Dissomphalus hetus</i>	M20 T991		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus jolus</i>	M21 T202	x	x	2	Tailândia

<i>Dissomphalus jubus</i>	M24 T1097	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus julius</i>	A4 M14 T2977		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus krombei</i>	DOC388	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus lidinus</i>	M37 T2812 1	x		N	Tailândia
<i>Dissomphalus lidinus</i>	M37 T2812 2	x		N	Tailândia
<i>Dissomphalus linearis</i>	DOC423	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus magnetus</i>	M35 T568	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus manus</i>	DOC352	x	x	2	Brasil
<i>Dissomphalus megamphalus</i>	DOC412	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus nandus</i>	M23 T3127		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus plaumanni</i>	DOC354	x	x	2	Brasil
<i>Dissomphalus plaumanni</i>	DOC425	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus prilus</i>	A9 M04 T4766		x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus prilus</i>	M04 T2974	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus punctatus</i>	DOC355	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus punctatus</i>	DOC358	x	x	2	Brasil
<i>Dissomphalus rectilneus</i>	ES08858	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus refertus</i>	DOC357	x	x	2	Brasil
<i>Dissomphalus sp.</i>	A137 MG4104		x	2	Madagascar
<i>Dissomphalus sp.</i>	A138 MG4104		x	2	Madagascar
<i>Dissomphalus sp.</i>	A143 BLF20683		x	2	Comoros
<i>Dissomphalus sp.</i>	A144 BLF20683		x	2	Comoros
<i>Dissomphalus sp.</i>	A145 BLF20683		x	2	Comoros
<i>Dissomphalus sp.</i>	A146 BLF20683		x	2	Comoros
<i>Dissomphalus sp.</i>	A192		x	2	Madagascar
<i>Dissomphalus sp.</i>	A194		x	2	Madagascar
<i>Dissomphalus sp.</i>	A109 M89		x	2	Rep. Cen. Africana
<i>Dissomphalus sp.</i>	A70		x	2	Madagascar
<i>Dissomphalus sp. 1 Carr</i>	GU213949.1*		x		Tailândia
<i>Dissomphalus sp. 3 Carr</i>	GU213950.1*		x		Tailândia
<i>Dissomphalus sp. Sem processo</i>	A116 M89		x	2	Rep. Cen. Africana
<i>Dissomphalus thaianus</i>	T1097	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus thaianus</i>	T3665	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus thaianus</i>		x		2	
<i>Dissomphalus turinus</i>	M27 T2810 1	x		N	Tailândia
<i>Dissomphalus turinus</i>	M27 T2810 2	x		N	Tailândia
<i>Dissomphalus umbilicus</i>	DOC359	x		2	Brasil
<i>Dissomphalus unitus</i>	DOC391		x	2	Panamá
<i>Dissomphalus vallensis</i>	DOC		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus vallensis sp.nov1</i>	DOC366		x	2	Brasil
<i>Dissomphalus verus</i>	A11 M02		x	2	
<i>Dissomphalus verus</i>	A14 M02		x	2	
<i>Dissomphalus verus</i>	DOC48	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus verus</i>	M02 A11	x		2	Tailândia
<i>Dissomphalus wusheanus</i>	T2810	x	x	2	Tailândia
<i>Dissomphalus zethus</i>	M18 T106	x	x	2	Tailândia
<i>Foenobethylus emeliascallae</i>	DOC238		x	2	
<i>Foenobethylus emiliacasellae Carr</i>	GU213952*				Tailândia

<i>Foenobethylus</i> sp.	DOC242		x	2	
<i>Gen. Indet.</i>	A114 M89	x	x	3	Rep. Cen. Africana
<i>Gen. Indet.</i>	A149 M166		x	3	Rep. Cen. Africana
<i>Gen. Indet.</i>	A156 M166		x	3	Rep. Cen. Africana
<i>Parascleroderma</i> sp.	DOC230		x	N	
<i>Parascleroderma</i> sp.	DOC263		x	N	
<i>Pristocera</i> sp.	A198		x	N	Madagascar
<i>Pristocera</i> sp.	DOC135	x		N	
<i>Pristocera</i> sp.	DOC68	x	x	N	
<i>Pristocera</i> sp. 1 Carr	GU213954.1*				Tanzânia
<i>Pristocera</i> sp. CASENT0006958	EF013049.1*				Madagascar
<i>Pristocera</i> sp. JMH-2010	GQ374729*				
<i>Protisobrachium</i> sp.	A128 M161		x	N	Rep. Cen. Africana
<i>Protisobrachium</i> sp.	A131 M228	x		N	Rep. Cen. Africana
<i>Protisobrachium</i> sp.	A135 M184	x		N	Rep. Cen. Africana
<i>Protisobrachium</i> sp.	A34 M22 T662	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A35 M22 T667	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A36 M22 T2167	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A37 M22 T2895	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A38 M22 T870	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A40 M22 T726	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A42 M22 T1332	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp.	A76	x	x	N	Madagascar
<i>Protisobrachium</i> sp.	M22 T1060	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp. M26	A151 M26 T1585	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp. M26	A44 M26 T2397	x		N	Tailândia
<i>Protisobrachium</i> sp. M26	A52	x		N	Madagascar
<i>Protisobrachium</i> sp. M26	A54	x		N	Madagascar
<i>Pseudisobrachium</i> sp.	DOC395		x	N	
<i>Pseudisobrachium</i> sp.	A	x		N	Tailândia
<i>Pseudisobrachium</i> sp.	DOC69	x		N	
<i>Pseudisobrachium</i> sp. Carr	GU213955.1*		x	N	Tanzânia
<i>Sierola cf anthacina</i>	DOC260	x	x	N	Estados Unidos
<i>Sierola gracile</i>	DOC262	x	x	N	Estados Unidos
<i>Trichiscus</i> sp. Carr	GU213953.1*		x	3	Tanzânia
<i>Trichiscus suzannae</i>	A119 KZM04		x	3	África do Sul
<i>Trichiscus suzannae</i>	A120 KZM04	x	x	3	África do Sul
<i>Trichiscus suzannae</i>	A121 KZM08		x	3	África do Sul
<i>Trichiscus suzannae</i>	A123 KZN08		x	3	África do Sul
<i>Trichiscus wittei</i>	A109 M231	x		3	Rep. Cen. Africana
<i>Trichiscus wittei</i>	A112 M231		x	3	Rep. Cen. Africana
<i>Trichiscus wittei</i>	A113 M89		x	3	Rep. Cen. Africana

* Número de registro no *GenBank*

P – Presença de processo tergal

N – Sem processo tergal

2 – Processo tergal no segundo tergito

3 – Processo tergal no terceiro tergito

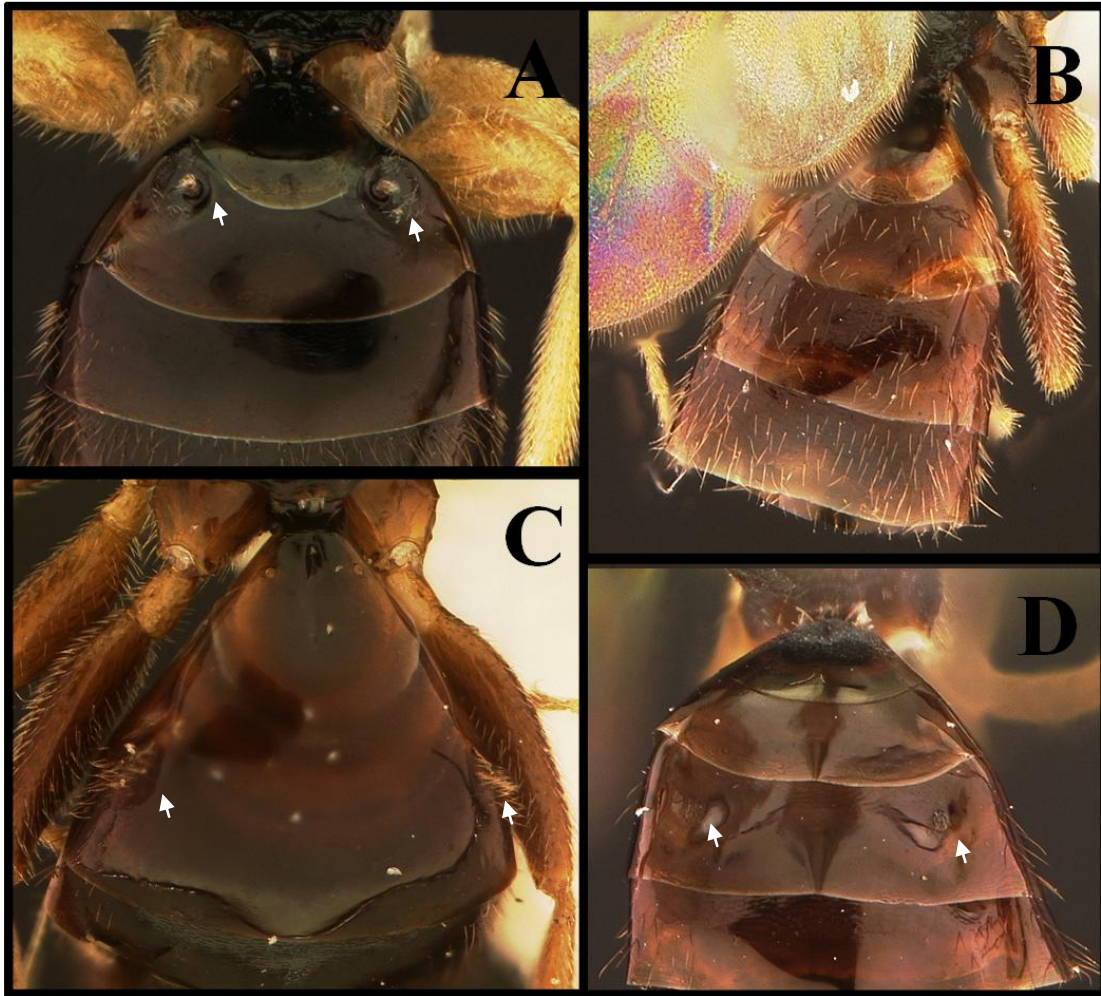


Figura 33: Metassomo em vista dorsal revelando o processo tergal (setas brancas), quando presente. A, *Dissomphalus verus* com processo tergal no segundo tergito. B, *Protisobrachium* sp. sem processo. C, *Trichiscus* sp. com processo tergal no terceiro tergito. D, Gênero Indeterminado com processo tergal no terceiro tergito.

RNAr 28S

- Neotrópica
- Oriental
- Etiópica

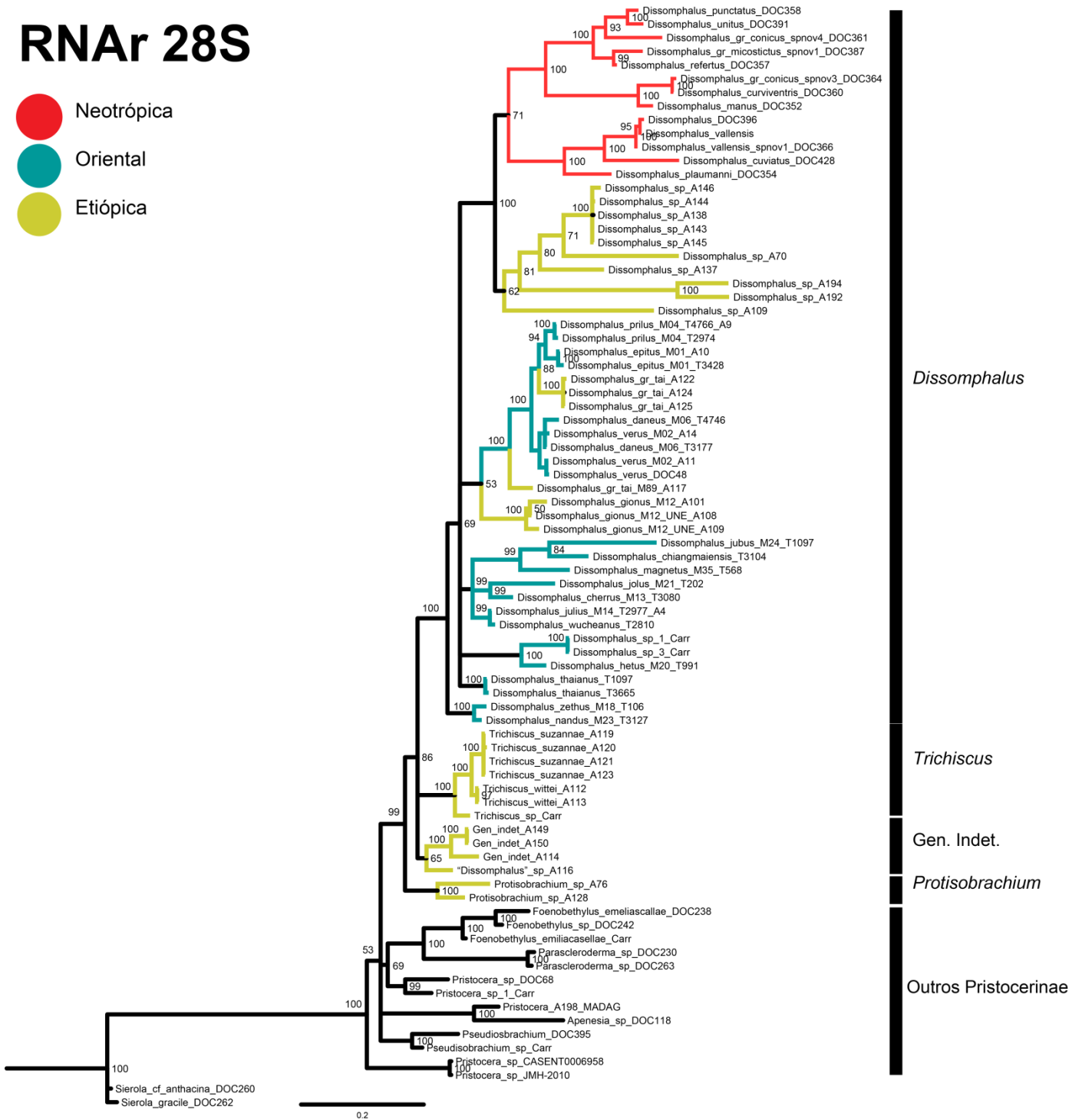


Figura 34: Inferência filogenética bayesiana de 28S de Pristocerinae. Os números próximos dos nós representam probabilidade posterior. As cores são referentes a região zoogeográfica conforme indicada no canto superior direito da figura.

COI

- Neotrópica
- Oriental
- Etiópica

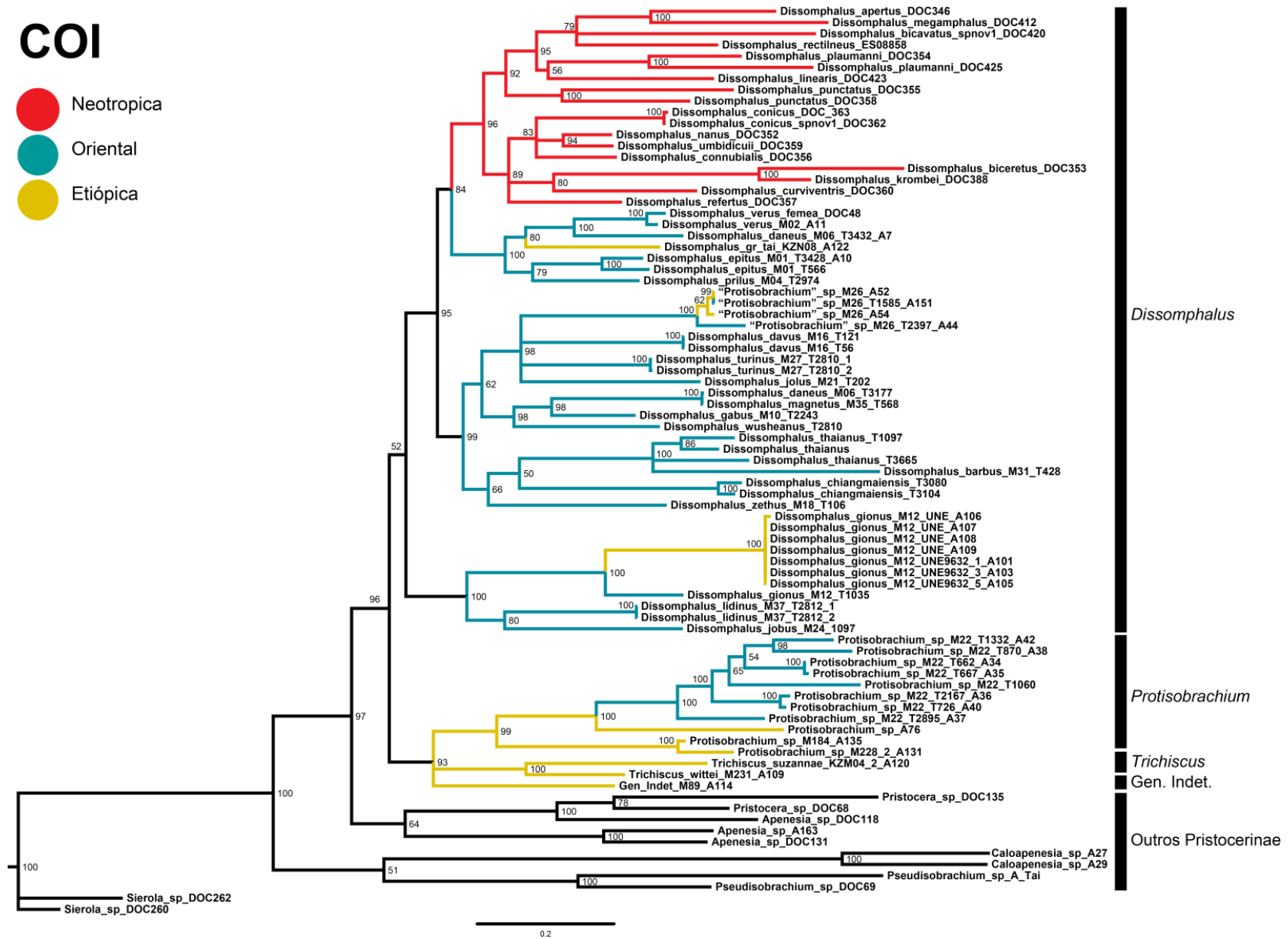


Figura 35: Inferência filogenética bayesiana de COI de Pristocerinae. Os números próximos dos nós representam probabilidade posterior. As cores são referentes a região zoogeográfica conforme indicada no canto superior direito da figura.

4. Apêndice – Ilustrações de exemplares

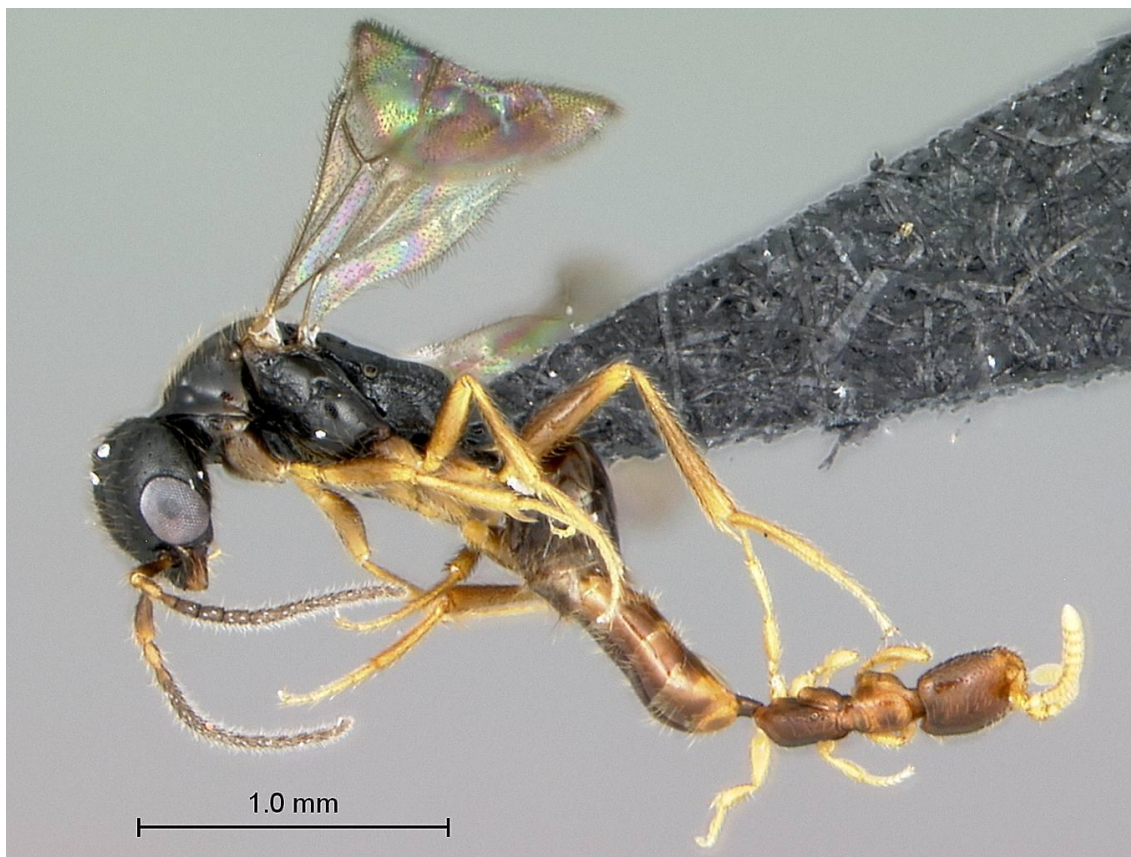


Figura 36: *Dissomphalus* sp. coletado em cópula forética. Macho alado e a fêmea áptera. (Retirado de www.waspweb.org)

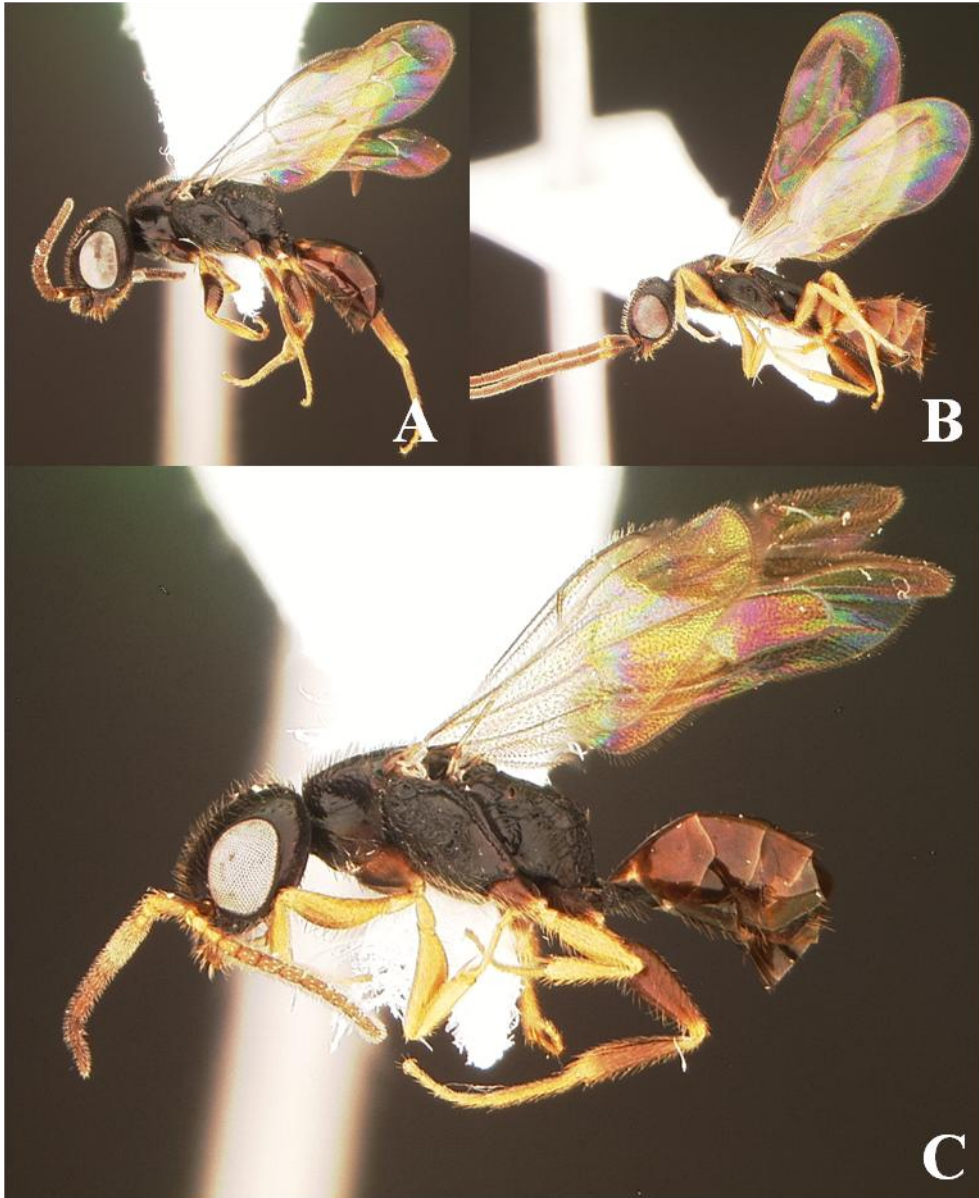


Figura 37: Habitus de *Trichiscus* sp. (A), *Protisobrachium* (B) e Genêro Indeterminado (C). (Fotografado por Diego Barbosa)