

TÉRCIA VARGAS DOS SANTOS

**SISTEMÁTICA DO SUBGÊNERO *PELTECANTHON*  
(SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Santos, Tércia Vargas dos, 1983-  
S237s               Sistemática do subgênero *Peltecanthon* (Scarabaeidae:  
2017               Scarabaeinae) / Tércia Vargas dos Santos. – Viçosa, MG, 2017.  
                      viii, 83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.69-76.

1. Besouros. 2. Morfologia (Animal). 3. Filogenia.  
4. Biologia - Classificação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação  
em Entomologia. II. Título.

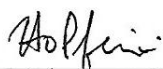
CDD 22 ed. 595.76

TÉRCIA VARGAS DOS SANTOS

**SISTEMÁTICA DO SUBGÊNERO *PELTECANTHON* (SCARABAEIDAE:  
SCARABAEINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de fevereiro de 2017.



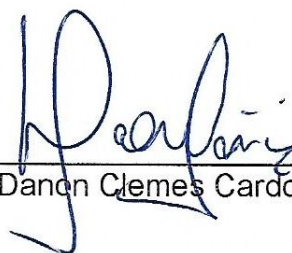
Vera Nisaka Solferini



Cristiano Lopes Andrade



Aline Ramos Fregonezi



Danton Cledes Cardoso



Karla Suemy Clemente Yotoko  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do curso.

Aos órgãos de fomento: CNPq, pela concessão da bolsa de estudos; FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À Professora Karla Yotoko, primeiramente (Fora Temer) pela amizade, fundamental para que eu enfrentasse o desafio, pelo incentivo e liberdade no caminho trilhado, além da excelente orientação.

Aos coorientadores: Júlio Louzada (UFLA), pelo apoio inicial na construção do projeto e Fernando Vaz-de-Mello (UFMT) pelo apoio em todas as etapas deste trabalho e por acreditar em nosso trabalho mesmo à distância.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e ainda: Aline Fregonezzi, pela amizade e parceria em coleta; Cristiano Lopes e Danon Clemes pelas contribuições desde a qualificação até a execução deste trabalho; e Vera Solferini, que desde o mestrado me apoiou e que foi fundamental para que eu estivesse hoje em Viçosa.

Aos parceiros que contribuíram com exemplares para a amostragem dos besouros e engrandeceram esse trabalho: Profa. Rita Moura (Universidade do Pernambuco), Cristiane Costa (ULFA) e Rafael Nunes (UFMT).

Ao Professor Carlos Sperber (UFV) pelo apoio logístico para realização das viagens a campo.

A todos os integrantes e amigos do Laboratório de Bioinformática e Evolução e do Laboratório de Ecologia, em especial aos parceiros Leandro, Cainã, Kamilla e Arthur, que colaboraram com as coletas e trabalho de bancada. Gratidão pelo convívio, pelos cafezinhos, pelas iscas, pelos risos... Agradecimentos a todos os amigos e parceiros de coletas que colaboraram de alguma forma com a execução desse trabalho.

A todos os amigos de caminhada viçosense, em especial ao Edmo, Sara, Mary, Malu, Nat, pelos ombros amigos e força constante.

Aos anjos-da-guarda Reginalda e André, sem os quais eu não teria chegado até aqui. E aos amigos que me acolheram com muito amor no movimento espírita, em especial aos grupos do NEU e RELIGARE.

Ao meu pai pela amizade à distância e pelo incentivo no despertar e à minha mãe, pela oportunidade do perdão e do autoperdão. Ao meu irmão, por cuidar de tudo enquanto eu cuidava da minha vida.

Ao Glauco por ter chegado em minha vida trazendo novas cores e novos desafios.

A Deus pela genialidade da reencarnação, aprendizado eterno.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                            | <b>v</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                          | <b>vii</b> |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                                                  | <b>1</b>   |
| Sistemática do subgênero <i>Peltecanthon</i> .....                                                                                             | 1          |
| Ferramentas para estudo sistemático .....                                                                                                      | 5          |
| Sistemática molecular .....                                                                                                                    | 5          |
| Seleção de modelos .....                                                                                                                       | 6          |
| Inferência Bayesiana .....                                                                                                                     | 7          |
| O DNA Barcoding.....                                                                                                                           | 8          |
| Morfometria Geométrica .....                                                                                                                   | 10         |
| Estudo dos padrões de coloração .....                                                                                                          | 14         |
| <b>CAPÍTULO 1 – A sistemática de <i>Peltecanthon</i> (Scarabaeidae: Scarabaeinae) e o problema da manutenção de caracteres ancestrais.....</b> | <b>16</b>  |
| 1.1. Introdução.....                                                                                                                           | 16         |
| 1.2. Material e métodos .....                                                                                                                  | 18         |
| 1.2.1. Amostragem .....                                                                                                                        | 18         |
| 1.2.2. Análises das relações filogenéticas .....                                                                                               | 18         |
| 1.2.3. Morfometria geométrica.....                                                                                                             | 21         |
| 1.3. Resultados.....                                                                                                                           | 23         |
| 1.3.1. Amostragem .....                                                                                                                        | 23         |
| 1.3.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA .....                                                                                    | 29         |
| 1.3.3. Análises filogenéticas .....                                                                                                            | 31         |
| 1.3.4. Análises morfométricas.....                                                                                                             | 32         |
| 1.4. Discussão.....                                                                                                                            | 35         |

|                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 2: Detecção de espécies crípticas em <i>Canthon staigi</i> (Scarabaeidae: Scarabaeinae): uma abordagem multidisciplinar .....</b> | <b>38</b> |
| 2.1. Introdução.....                                                                                                                          | 38        |
| 2.2. Material e Métodos .....                                                                                                                 | 39        |
| 2.2.1. Amostragem .....                                                                                                                       | 39        |
| 2.2.2. Análise molecular .....                                                                                                                | 40        |
| 2.2.4. Morfometria geométrica .....                                                                                                           | 44        |
| 2.2.5. Análise dos padrões de coloração corporal .....                                                                                        | 47        |
| 2.3. Resultados.....                                                                                                                          | 49        |
| 2.3.1. Amostragem .....                                                                                                                       | 49        |
| 2.3.2. Análises filogenéticas .....                                                                                                           | 51        |
| 2.3.4. Análises morfométricas.....                                                                                                            | 58        |
| 2.3.5. Análise dos padrões de coloração corporal .....                                                                                        | 61        |
| 2.4. Discussão.....                                                                                                                           | 63        |
| <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>                                                                                                                  | <b>68</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                       | <b>69</b> |
| <b>ANEXO I .....</b>                                                                                                                          | <b>77</b> |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                                              | 77        |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                              | 82        |

## RESUMO

SANTOS, Tércia Vargas dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Sistemática do subgênero *Peltecanthon* (Scarabaeidae: Scarabaeinae).** Orientadora: Karla Suemy Clemente Yotoko. Coorientadores: Fernando Zagury Vaz de Mello e Júlio Neil Cassa Louzada.

*Canthon staigi* é uma espécie de besouro rola-bosta abundante em restingas da Mata Atlântica, sendo considerada bioindicadora da qualidade ambiental. Pertence ao subgênero *Peltecanthon* juntamente com outras duas espécies, *C. sulcatus* e *C. auricollis*. A primeira, *C. sulcatus* apresenta semelhanças morfológica, comportamental e ecológica com *C. staigi*, além de coocorrer em diversas localidades. A segunda espécie, *C. auricollis* apresenta morfologia diferenciada das outras duas, além de ocorrer em ambientes mais restritos e de altitude mais elevada. *Canthon auricollis* nunca coocorre com *C. staigi* e *C. sulcatus*. Os poucos trabalhos que tentaram sistematizar *Peltecanthon* envolvem apenas aspectos da morfologia geral e sugerem que *C. sulcatus* e *C. staigi* sejam espécies irmãs. No primeiro capítulo desta tese, nós apresentamos uma hipótese filogenética (baseada em dois marcadores, um mitocondrial – COI – e um nuclear – ITS2) na qual *C. staigi* é uma linhagem monofilética dentro de *Peltecanthon* e *C. sulcatus* e *C. auricollis* são espécies irmãs. Este resultado é inesperado dadas as semelhanças morfológicas, ecológicas e comportamentais de *C. sulcatus* e *C. staigi*. Isto nos levou a hipotetizar um cenário evolutivo no qual *C. auricollis* se diferenciou de *C. sulcatus* em uma população pequena e isolada, na qual a deriva genética pode ter atuado e permitido grandes modificações morfológicas. Por outro lado, *C. staigi* e *C. sulcatus* teriam permanecido em grandes populações, que mantiveram a maior parte dos caracteres ancestrais, explicando as semelhanças que guardam entre si e com outras espécies do gênero *Canthon*. O mesmo padrão de divisão de *Peltecanthon* foi encontrado em análises de morfometria geométrica da asa. A inferência filogenética do Capítulo 1 evidencia ainda a existência de três linhagens evolutivas independentes em *C. staigi*, o que foi avaliado no Capítulo 2 deste trabalho. Neste segundo capítulo, investigamos essas três linhagens (presumivelmente três espécies) com os dois marcadores moleculares (de forma independente) e detectamos, pela metodologia do *Barcoding*, uma diferenciação entre as linhagens compatível com a diferenciação entre espécies próximas. Além disso, a morfometria geométrica das asas sustenta a existência de três grupos distintos, enquanto padrões de coloração dos

élitros separam a linhagem mais ao sul (coletadas no litoral de São Paulo) das demais. Nossos resultados sugerem a manutenção de caracteres morfológicos ancestrais em besouros do gênero *Canthon* e ressaltam a necessidade de estudos multidisciplinares para resolver a sistemática do grupo. Especificamente, o Capítulo 2 sugere uma revisão taxonômica que dê suporte às supostas três espécies crípticas que hoje estão sob a denominação *C. staigi*.

## ABSTRACT

SANTOS, Tércia Vargas dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Systematic of the subgenus *Peltecanthon* (Scarabaeidae: Scarabaeinae)**. Advisor: Karla Suemy Clemente Yotoko. Co-advisors: Fernando Zagury Vaz de Mello and Júlio Neil Cassa Louzada.

*Canthon staigi* is an abundant dung beetle in sand dunes of the Atlantic Forest, frequently used as a bioindicator of the environment quality. With other two species, *C. sulcatus*, and *C. auricollis*, *C. staigi* belongs to the subgenus *Peltecanthon*. *Canthon sulcatus* present several morphological, behavioral and ecological similarities with *C. staigi* and co-occur with it in several localities. *Canthon auricollis* shows a differentiated morphology and occurs in more restrict environments, usually in higher altitudes and never co-occurs with the other two species. The few works that tried to systematize *Peltecanthon* involve only general morphological traits and suggest a clade containing *C. sulcatus* and *C. staigi*. The first chapter of this thesis shows a phylogenetic hypothesis (based on two molecular markers, the mitochondrial COI, and the nuclear ITS2) that presents *C. staigi* as a monophyletic lineage of *Peltecanthon* that is a sister species of the clade *C. sulcatus* + *C. auricollis*. This is an unexpected result giving the morphological, ecological and behavioral similarities of *C. sulcatus* and *C. staigi*. It let us hypothesize an evolutionary scenario in which *C. auricollis* differentiated from *C. sulcatus* in a small and isolated population, where the genetic drift acted and allowed great morphological modifications. On the other hand, *C. staigi* and *C. sulcatus* remained in large populations, that maintained most of the ancestral traits, also shared with other *Canthon* species. Our geometric morphometry found the same pattern of subdivision in *Peltecanthon*. The phylogenetic inference of the Chapter 1 also suggests that *C. staigi* is subdivided in three independent evolutionary lineages, which were investigated in the Chapter 2. In Chapter 2, we used the molecular markers independently, and detected, through the barcoding methodology, a differentiation compatible with different species. Moreover, the geometric morphometry of the wings supports the subdivision in three groups, and the collar patterns analysis splitted two groups, the first with the most Southern species (sampled in São Paulo) and the other with the remaining species. Our results suggest the maintenance of ancestral traits in *Canthon* and highlight the need of multidisciplinary approaches to solve the systematics

of this group. Specifically, our Chapter 2 suggests a taxonomic review that supports the putative three cryptic species under *C. staigi*.

## INTRODUÇÃO GERAL

### Sistemática do subgênero *Peltecanthon*

A subfamília Scarabaeinae compreende cerca de 7.000 espécies distribuídas ao redor do mundo (Schoolmeesters *et al.* 2010), com grande abundância em regiões tropicais e subtropicais (Hanski & Cambefort 1991), onde formam uma comunidade bem definida em termos taxonômicos e funcionais (Halffter & Edmonds 1982). Até o ano 2000, Vaz-de-Mello havia registrado mais de 1.250 espécies para a subfamília Scarabaeinae na América do Sul, sendo 618 para o Brasil, metade das quais foi considerada endêmica (Vaz-de-Mello 2000).

Estes besouros são considerados organismos generalistas e capazes de ocupar diversos habitats (Korasaki *et al.* 2012). São popularmente conhecidos como rola-bosta pelo hábito de construir esferas com matéria orgânica em decomposição (fezes, carniça, fungos e frutas em decomposição), que serão transportadas até locais protegidos onde constroem seus ninhos e depositam seus ovos (Halffter & Matthews 1966). Apesar da existência de espécies endêmicas de ambientes hostis como as restingas (Vaz-de-Mello *et al.* 2001; Vieira *et al.* 2008), acredita-se que muitas das espécies encontradas em tais ambientes sejam oriundas de matas próximas, que migraram para áreas de restinga e hoje suportam bem ambos os ambientes (Milhomem *et al.* 2003; Endres *et al.* 2007). De fato, há registros de espécies muito abundantes em restingas arbóreas brasileiras e que também ocupam áreas de remanescentes florestais na região de Mata Atlântica (Costa *et al.* 2008), como algumas espécies do gênero *Canthon* Hoffmansegg, 1817.

Uma das maiores e mais antigas tribos de Scarabaeinae é Deltophilini (Davis *et al.* 2002), cujos gêneros apresentam hábitos alimentares variados, sendo em sua maioria copronecrófagos e rola-bostas (Vaz-de-Mello 1999). Fatores históricos e ecológicos explicam a grande representatividade da tribo na região Neotropical (Vaz-de-Mello 1999). Nesta tribo, o gênero *Canthon* é um dos mais representativos, sendo a maioria das cerca de 200 espécies neotropical e copronecrófaga (Vaz-de-Mello 1999). A história

taxonômica desse gênero é marcada por dificuldades na definição dos caracteres diagnósticos e na organização interna dos grupos que o compõem (Medina *et al.* 2003). *Canthon* apresenta grande variação nos padrões de coloração de indivíduos da mesma espécie em diferentes regiões geográficas, o que, em alguns casos, pode ter implicações na taxonomia do grupo (Medina *et al.* 2003). É o caso da espécie *Canthon cyanellus* LeConte, 1859, cuja classificação em subespécies é baseada nos padrões de coloração corporal (Solís & Kohlmann 2002), mas que não sustentam linhagens evolutivas válidas quando analisados por ferramentas moleculares (Nolasco-Soto *et al.* 2017, no prelo).

Dentre os atuais subgêneros de *Canthon*, *Peltecanthon* (Pereira, 1953) foi descrito como um gênero para abrigar a nova espécie *Peltecanthon staigi* e a já descrita *Canthon sulcatus* Castelnau, 1840. Segundo Pereira (1953), o escutelo visível, ainda que pequeno, justifica a proposição de um novo gênero, já que outros *Canthon* apresentam o mesonoto sem escutelo visível. Embora os gêneros *Megatopha* e *Eudinopus* também apresentem o escutelo visível, *Peltecanthon* se assemelha mais a *Canthon* pelo “fâcies”, pelo clipeo bidentado, pelos élitros lisos e desprovidos de estrias (Pereira 1953). Em 1967, Halffter & Martínez apresentaram uma primeira caracterização do gênero *Peltecanthon*, baseada nas características de *P. staigi* e *P. sulcatus*, mantendo seu status de gênero por considerar inadequado inserir uma heterogeneidade em *Canthon* (referindo-se ao escutelo visível). Esses autores ressaltaram a proximidade de *Peltecanthon* ao então também considerado gênero *Goniocanthon* (Pereira & Martínez, 1956). No entanto, dez anos depois, esses mesmos autores consideraram *Peltecanthon* como um subgênero de *Canthon* (Halffter & Martínez 1977), com a inclusão de uma nova espécie: *Canthon (Peltecanthon) auricollis* Redtenbacher, 1867, cujo escutelo não é visível mas apresenta a forma característica das espécies de *Peltecanthon*. *Goniocanthon* também assume o status de subgênero e é agrupado a *Peltecanthon* (Halffter & Martínez 1977). Assim, em seu status atual, o subgênero *Peltecanthon* inclui três espécies: *C. (P.) staigi*, *C. (P.) sulcatus* e *C.(P.) auricollis*. Nenhuma revisão mais recente foi encontrada na literatura e as informações acerca das espécies em geral apresentam abordagens ecológicas (Schiffler *et al.* 2003; Costa *et al.* 2013, 2014; Lima 2013; Hernández *et al.* 2014; Medina & Lopes 2014; Filgueiras 2015; Salomão e Iannuzzi 2015; Campos & Almeida 2016; Menéndez *et al.* 2016), comportamental (Iannuzzi *et al.* 2016; Salomão *et al.*

2016) ou genética (Bione 2004; Cabral-de-Mello *et al.* 2011; Ferreira-Neto *et al.* 2014ab; Ferreira-Neto *et al.* 2016).

Das três espécies de *Peltecanthon*, *C. staigi* (Figura 0.1C-E) apresenta a maior distribuição geográfica, que abrange quase toda a costa brasileira, dos estados da Paraíba ao Paraná, havendo também registros no interior, especificamente nos estados de Minas Gerais e Amazonas, além de serem também encontrados no norte da Argentina e no Paraguai (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967, 1977). Embora Halffter & Martínez (1967, 1977) tenham atribuído a esta espécie uma preferência por locais úmidos e escuros, estudos recentes relataram sua ocorrência no estrato arbóreo das restingas (Vieira *et al.* 2008), onde é bastante abundante em locais preservados (Costa *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2014). O padrão de coloração dessa espécie varia entre verde (morfotipo mais comum), azul e verde levemente dourado (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967). Halffter & Martínez (1967) relataram um padrão de distribuição de coloração onde os exemplares azulados são aqueles provenientes de regiões mais montanhosas nos estados do Paraná e São Paulo, bem como na província de Misiones, na Argentina. Já os exemplares provenientes de regiões de menor altitude, no Brasil, Paraguai ou Argentina, apresentam coloração verde ou verde-dourado, com ventre azul esverdeado ou azul escuro (Halffter & Martínez 1967).

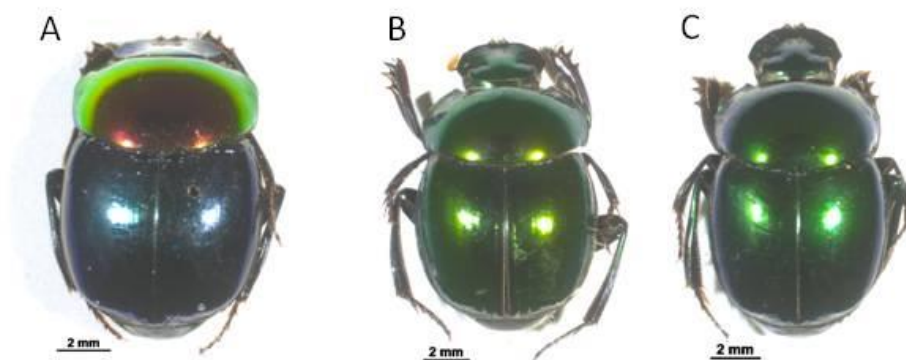
Comparada a *C. staigi*, *C. sulcatus* (Figura 0.1B) é mais restrita, com distribuição descrita na literatura para a costa leste brasileira do sul da Bahia ao Rio de Janeiro, além de um registro na Argentina (Halffter & Martínez 1967). Além da área de ocorrência das duas espécies apresentar sobreposição, há também registros de coocorrência em algumas localidades (Halffter & Martínez 1967). Segundo Halffter & Martínez (1967), a abundância de *C. sulcatus* é muito menor que de *C. staigi* (aproximadamente 1:20), apesar dos hábitos serem similares. O padrão de coloração de *C. sulcatus* varia entre verde e dourado (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967) e em áreas de coocorrência com *C. staigi*, ambas apresentam o mesmo padrão de coloração, bem como as mesmas necessidades ecológicas e hábitos (Halffter & Martínez 1967).

*Canthon staigi* e *C. sulcatus* são espécies de morfologia muito similar, distinguindo-se pelas características listadas na Tabela 0.1 (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967).

Em 1867, Redtenbacher descreveu *C. auricollis* (Figura 0.1A), trazendo poucos detalhes morfológicos e anatômicos e indicando o “Brasil” como área de ocorrência. A espécie foi ignorada na revisão do gênero feita por Halffter & Martínez (1967), que posteriormente a incluíram como membro do subgênero *Peltecanthon* e a sinonimizaram com *C. splendidus* Schmidt, 1922 (Halffter & Martínez 1977), sem acrescentar qualquer informação sobre a espécie, como morfologia ou área de ocorrência. Como se observa nos outros *Peltecanthon*, *C. auricollis* apresenta a superfície dorsal muito polida e brilhante e os fêmures posteriores claviformes e sem marginação na superfície ventral (Halffter & Martínez 1977). Há poucos exemplares depositados em coleções de referência (Vaz-de-Mello, comunicação pessoal). Segundo a descrição original, *C. auricollis* apresenta élitro azul metálico brilhante e cabeça vermelho-dourada (Redtenbacher 1867). Além da coloração diferenciada, a espécie não apresenta escutelo visível (embora ele tenha a mesma forma, que é exclusiva deste subgênero dentro de *Canthon*), e tem o bordo anterior da cabeça quadridentado, enquanto nas outras duas espécies ele é bidentado (Halffter & Martínez 1977).

**Tabela 0.1:** Características diagnósticas comparadas entre *Canthon staigi* e *Canthon sulcatus* conforme a descrição original feita por Pereira (1953) e complementada por Halffter & Martínez (1967).

| <b>Pereira (1953)</b>                                |                                                    |                                 |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Característica diagnóstica</b>                    | <b><i>Canthon staigi</i></b>                       | <b><i>Canthon sulcatus</i></b>  |
| Carenas transversais no prosterno                    | Presentes                                          | Ausentes                        |
| Sulco nos fêmures médios e posteriores               | Ausente                                            | Presente na margem posterior    |
| Metade basal da tíbia posterior*                     | Pontuada                                           | Não pontuada                    |
| Élitros                                              | Apenas estriados                                   | Estrias manifestas              |
| Pigídio                                              | Liso e sem pontos                                  | Finamente pontuado              |
| Coloração do ventre                                  | Mais brilhante                                     | Mais opaco e finamente pontuado |
| Coloração corporal                                   | Verde-dourado ou azul                              | Verde a verde-dourado           |
| Tamanho                                              | De 10 a 16 mm                                      | De 11 a 13 mm                   |
| <b>Halffter &amp; Martínez (1967)</b>                |                                                    |                                 |
| Quilha transversal entre proepisternos e proepímeros | Presente, mas não chega à borda externa do pronoto | Ausente                         |
| Fêmures meso e metaroráxicos                         | Sem borda                                          | Com borda na margem posterior   |
| Sulco na base dos fêmures posteriores                | Ausente                                            | Presente na borda posterior     |



**Figura 0.1:** Espécimes de *Peltecanthon* **A:** *Canthon auricollis*, Vargem Alta-MG; **B:** *Canthon sulcatus*, Trapiche-PE; **C:** *Canthon staigi*, Linhares-ES.

## Ferramentas para estudo sistemático

### *Sistemática molecular*

A identificação de espécies é parte fundamental da descrição da biodiversidade. No entanto, a identificação tradicional de espécies baseada em características morfológicas torna-se um desafio frente a um cenário em que o número de taxonomistas especialistas em cada grupo específico de organismos tem diminuído com o passar dos anos. A identificação molecular de espécies surge então nesse cenário como uma alternativa viável, prática e de baixo custo, principalmente considerando o avanço nas tecnologias de sequenciamento e barateamento dos custos das análises (Busse *et al.* 1996; Jinbo *et al.* 2011).

Apesar de ser cada vez mais utilizada, a chamada sistemática filogenética (inferência das relações filogenéticas entre espécies e sua aplicação na classificação destas) ainda não é familiar para a maioria dos pesquisadores das áreas biológicas, seja devido aos métodos analíticos, seja pelos numerosos *softwares* requeridos (Yang & Rannala 2012). Observamos, nas últimas décadas, um grande crescimento da

capacidade de geração de informações genéticas sobre organismos, principalmente devido ao avanço tecnológico em metodologias como, por exemplo, a de sequenciamento de DNA (Garrick *et al.* 2015). Aliado a isso, o aumento da capacidade de análise dessas informações foi viabilizado pelo avanço na capacidade de operação dos computadores e dos poderosos programas desenvolvidos.

Em consequência destes avanços tecnológicos, um expressivo número de sequências de DNA tem sido produzido por pesquisadores ao redor do mundo e disponibilizado na internet em bancos de dados públicos como o *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?db=nucleotide>). Sequências de DNA são ótimos objetos de estudo pois permitem relacionar organismos muito distantes utilizando características homólogas, ou seja, pesquisadores têm uma ferramenta padronizada e comparável para inferir sobre as relações entre os organismos.

A análise filogenética destas sequências, aliada aos estudos utilizando métodos tradicionais, pode auxiliar na compreensão da história evolutiva dos organismos (Tarasov & Génier 2015). Em besouros Scarabaeinae, os estudos filogenéticos com abordagens moleculares iniciaram no ano de 2002 (Villalba *et al.* 2002) e, desde então, verificamos uma crescente tendência no número de publicações (Tarasov & Génier 2015), que utilizam cada vez mais exemplares e diferentes marcadores. Estes autores, no entanto, chamaram atenção para a necessidade de apresentar estudos mais amplos, que combinem as abordagens tradicionais e modernas.

### ***Seleção de modelos***

A acurácia das inferências filogenéticas depende do uso de modelos adequados de evolução molecular (Simon *et al.* 2006) e esbarra nas limitações das inferências estatísticas, que necessitam de modelos de probabilidade que, para sequências de DNA são os modelos de substituição de nucleotídeos (Posada 2003). Esses modelos são critérios assumidos a respeito do processo de substituição de nucleotídeos entre diferentes sequências e descrevem a probabilidade de mudança de um nucleotídeo para outro (Posada 2003).

Numerosos programas estão disponíveis para a seleção de modelos, que visa definir o modelo mais simples possível para descrever a evolução de uma determinada sequência de DNA em um determinado conjunto de indivíduos (alinhamento) (Lanfear *et al.* 2012). Para as inferências filogenéticas deste trabalho, nós utilizamos o programa PartitionFinder2 (Lanfear *et al.* 2016), para inferir um modelo de substituição para partição, sendo as partições pré-definidas como genes que codificam diferentes enzimas, ou sequências a serem transcritas em diferentes RNAs. Cada gene codificador pode ser particionado por posição do códon, dado que a terceira costuma apresentar maior variação que a primeira, que por sua vez varia mais que a segunda posição do códon. O programa, além de calcular modelos diferentes para as diferentes partições, ainda informa quais partições podem ser agrupadas, de modo a reduzir o número de parâmetros a ser utilizado na filogenia.

### ***Inferência Bayesiana***

Dentre as diversas metodologias desenvolvidas para análise das sequências de DNA, a mais utilizada no momento é a Inferência Bayesiana. O uso desse método em sistemática filogenética iniciou-se ao final da década de 1990 (Rannala & Yang 1996) e seu crescimento só foi possível graças aos avanços nos métodos computacionais (Yang & Ranalla 2012). Neste trabalho, utilizamos somente a Inferência Bayesiana para as inferências filogenéticas por acreditar ser o método mais robusto disponível.

O trabalho envolveu o sequenciamento de dois fragmentos de DNA, um mitocondrial (uma parte do gene que codifica a enzima Citocromo Oxidase I – uma proteína essencial da cadeia respiratória – COI) e um nuclear (que corresponde à região do segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico – ITS2). Nós trabalhamos com hipóteses filogenéticas independentes para cada uma destas sequências e com uma hipótese conjunta, feita a partir das sequências concatenadas, que se restringiu aos indivíduos para os quais foram obtidas ambas as sequências.

Para inferir as hipóteses filogenéticas deste trabalho, nós utilizamos o programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) implementado no Portal Cipres (<https://www.phylo.org/>), de modo a reduzir o tempo

das análises. Em cada uma das três análises (uma para cada gene em separado e uma concatenada), fizemos com que o MrBayes percorresse o espaço de possibilidades ao longo de 50 milhões de passos de oito cadeias de Markov com pontos iniciais aleatórios (uma topologia aleatória, com valores de tamanhos de ramos e de parâmetros dos modelos de substituição de nucleotídeos aleatórios) divididas em duas corridas, cada uma com quatro cadeias, três quentes e uma fria. A cadeia fria de cada corrida é a que apresenta a maior verossimilhança entre as quatro cadeias, de modo que o status de cada cadeia pode se modificar ao longo do processo – uma cadeia quente no passo X pode se tornar a cadeia fria no passo X + 1. Cada passo significa uma pequena modificação em um dos parâmetros em análise (topologia, tamanhos de ramos e parâmetros dos modelos de substituição), sendo a verossimilhança calculada a cada passo. Sempre que a verossimilhança aumenta, a modificação é aceita e o próximo passo corresponderá à modificação do valor de outro parâmetro. Caso contrário, o parâmetro permanecerá com o mesmo valor e o valor de outro parâmetro será alterado. As cadeias frias e quentes se diferenciam pela magnitude das modificações que ocorrem a cada passo, sendo que nas cadeias quentes as modificações são maiores que nas cadeias frias. A cada 5000 gerações, o programa registra os valores dos parâmetros da cadeia fria de cada corrida (são as cadeias com maior verossimilhança).

Terminadas as 50 milhões de gerações, 25 % dos passos das Cadeias de Markov foram eliminados (este passo assegura a retirada de passos iniciais das Cadeias que não atingiram a faixa de maior verossimilhança) e os restantes foram utilizados para gerar uma topologia consenso (o consenso de todas as topologias obtidas na faixa de maior verossimilhança nas duas cadeias frias das duas corridas) com tamanhos de ramos médios. Este consenso foi considerado como a hipótese filogenética obtida para cada conjunto de dados. Ao lado de cada ramo, foi colocada sua probabilidade posterior (ou a frequência com que cada ramo apareceu no conjunto final de topologias).

## ***O DNA Barcoding***

Hebert *et al.* (2003ab) propuseram uma metodologia de identificação de espécies pela utilização de um “código de barras moleculares” (DNA *Barcoding*) utilizando fragmentos padronizados da sequência do gene mitocondrial que codifica a subunidade

I da enzima citocromo oxidase (COI). O pressuposto em que se baseia essa metodologia é de que dentro de cada espécie, a variação esperada é de até 3,0%, que deve ser menor que a variação entre espécies (Hebert *et al.* 2003ab). Visando facilitar as análises e evitar a necessidade do uso dos numerosos programas utilizados em inferências filogenéticas, o DNA *Barcoding* sugere apenas que as sequências sejam alinhadas e que seja construída uma topologia baseada no método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) utilizando um modelo bem simples de substituição de nucleotídeos como Jukes-Cantor (Jukes & Cantor 1969) ou Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980). O uso destes modelos simplificados se justifica pelo fato de que a distinção de espécies por DNA *Barcoding* só se justifica entre espécies muito próximas, de modo que seja improvável a necessidade de modelos mais elaborados, pensados para a comparação entre táxons distantes.

A metodologia tornou-se amplamente aceita pela comunidade científica e, com o projeto *Barcode of Life*, uma ampla variedade de espécies tem sido identificada e catalogada em um banco de dados mundial denominado *Barcode of Life Data Systems* (BOLD SYSTEMS – <http://www.boldsystems.org>) (Ratnasingham & Hebert 2007).

O uso do DNA *Barcoding* em sistemática filogenética passa por dois aspectos principais que são a identificação de espécies e a descoberta de novas espécies (Jinbo *et al.* 2011). A identificação de espécies depende da representatividade do banco de dados para o grupo taxonômico estudado, enquanto a descoberta de novas espécies é um processo de reconhecimento de que um determinado grupo de indivíduos e/ou populações compõe uma nova espécie, com destaque para a identificação de espécies crípticas e sugestão de novas espécies para estudos (Hebert *et al.* 2004).

Visando facilitar a identificação de linhagens que atendem aos pressupostos do DNA *Barcoding* a respeito da variabilidade intra e interespecífica, Puillandre *et al.* 2011 disponibilizaram um programa de livre acesso *online* que investiga o tamanho do *gap* entre linhagens de interesse, ou seja, o quanto a diferença interespecífica é maior que a intraespecífica. Essa ferramenta vem sendo utilizada como sustentação para as linhagens identificadas e proposição de novas espécies (Low *et al.* 2017).

O gênero *Canthon* apresenta cerca de 200 espécies (Vaz-de-Mello 1999) e é marcado por uma história taxonômica confusa devido a dificuldades em encontrar características que delimitem e organizem os seus grupos internos (Medina *et al.* 2003).

Estas dificuldades resultam do fato de que a morfologia do grupo tende a ser muito conservada (Medina 2000), apesar de haver evidências morfológicas (Medina *et al.* 2003) e moleculares (Tarasov & Dimitrov 2016) de que seja um gênero polifilético. Reconhecendo estas dificuldades e preocupados com a urgente necessidade de identificação de espécies frente à perda de biodiversidade mundial, Monaghan *et al.* (2005) recomendaram o uso do DNA *Barcoding* para identificação de espécies em *Canthon*.

Uma busca no BOLD SYSTEMS para sequências de Scarabaeinae resultou em 94 gêneros, incluindo 330 registros de *Canthon*, distribuídos entre 43 espécies. Não encontramos registros de espécies de *Peltecanthon* neste banco de dados nem qualquer outra espécie coletada no Brasil (dados de Dezembro/2016). No *Genbank*, que concentra as sequências publicadas na literatura científica, a busca por sequências de *Canthon* resultou em 110 sequências distribuídas entre 14 espécies identificadas, sendo COI o principal marcador com 70 registros, seguido de 28S com 22 registros; nenhum registro foi encontrado para sequências de ITS2 (dados de Dezembro/2016). Para *Peltecanthon*, nenhuma sequência de qualquer marcador foi encontrada no *Genbank* (dados de Dezembro/2016).

### ***Morfometria Geométrica***

Asas de insetos vêm sendo amplamente utilizadas como características informativas para estudos taxonômicos e filogenéticos. Seu formato bidimensional e a homologia no seu padrão de venação fornecem informações que podem ser tratadas quantitativamente a fim de buscar diferenças sutis entre os organismos proximamente relacionados (Klingenberg & McIntyre 1998). Um método que vem sendo amplamente utilizado com essa finalidade é a Morfometria Geométrica.

A morfometria geométrica se baseia na comparação de formas através de uma configuração obtida a partir de marcos anatômicos (Figura 0.2A). Os marcos anatômicos devem ser pontos de fácil identificação, presentes em todos os organismos da amostra. No caso da morfometria baseada na forma das asas, os marcos anatômicos correspondem a pontos onde há cruzamento ou terminação de nervuras, ou a junção de

uma nervura com a borda da asa ou qualquer ponto que possa ser facilmente identificado em todos os indivíduos, sendo presumivelmente homólogos. Os marcos anatômicos devem ser numerados na ordem em que são marcados e esta ordem deve ser a mesma em todos os indivíduos, de modo que o ponto 1 em uma configuração seja homólogo ao ponto 1 da outra configuração.

Antes de iniciar a comparação de formas, é necessário padronizar as configurações de marcos anatômicos, de modo que todas tenham o mesmo tamanho e estejam na mesma orientação e sentido, assim as diferenças entre elas serão correspondentes a diferenças de forma.

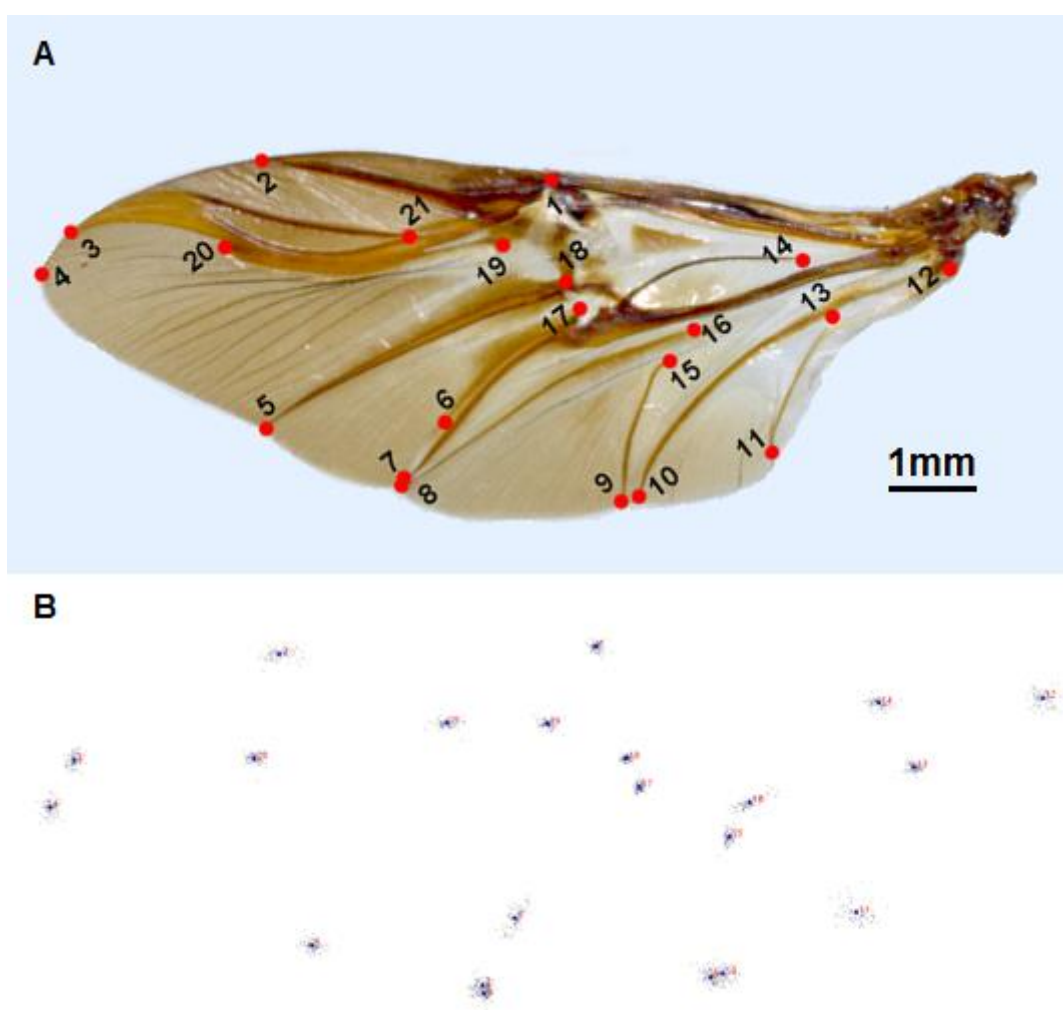
Para redimensionar todas as imagens de modo que todas as configurações tenham o mesmo tamanho, é necessário localizar o centroide (o centro de massa) de cada configuração e calcular o quadrado das distâncias de cada ponto ao centroide. O somatório destas medidas é o tamanho do centroide. Depois disso, basta redimensionar as configurações (sem alterar a forma) de modo que todas tenham o mesmo tamanho de centroide.

Para posicionar todas as asas na mesma orientação e sentido, é preciso situar o centroide de todas as configurações (já corrigidas pelo tamanho) no mesmo ponto. Depois disso, é necessário rotacionar cada configuração de modo que as distâncias de cada marco anatômico seja o menor possível entre as configurações. Esta padronização permite que os marcos anatômicos de todos os espécimes sejam plotados entre dois eixos cartesianos, X e Y.

Uma vez padronizadas as imagens, é possível inferir uma forma média (uma forma dada pelos pontos médios de cada marco anatômico considerando todos os espécimes em estudo – o centroide de cada marco anatômico nas coordenadas cartesianas – ponto azul na Figura 0.2B) que pode ser utilizada como referência para dimensionar a forma de cada espécime. É possível também calcular a diferença de forma entre dois indivíduos, entre um indivíduo e a forma média ou entre médias de diferentes populações.

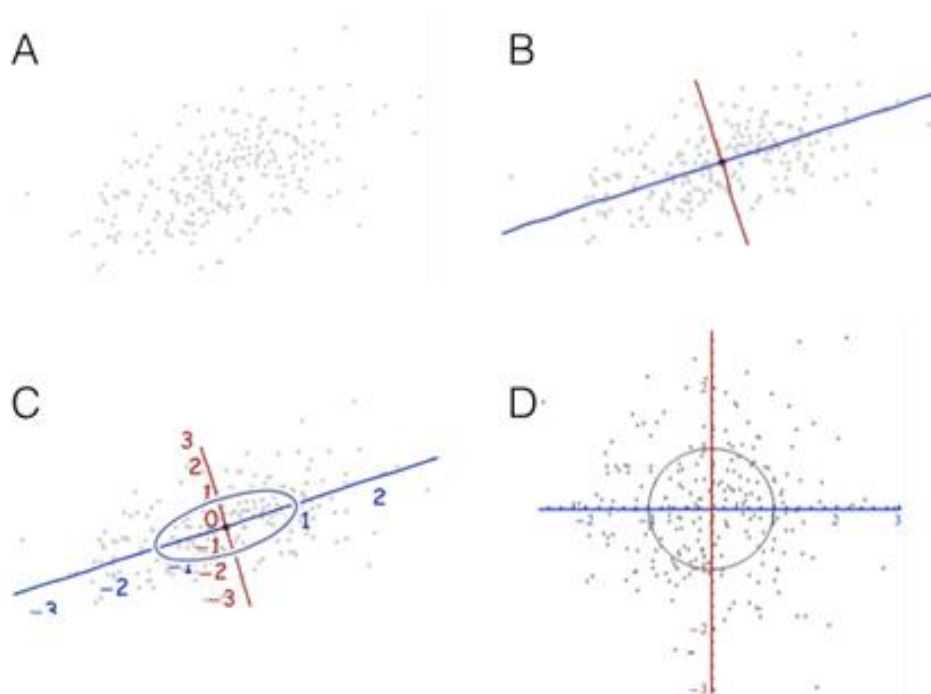
Neste trabalho, nós utilizamos as distâncias de Procrustes e de Mahalanobis para representar as diferenças entre espécimes ou entre um espécime e a conformação média. Ambas as distâncias requerem a padronização das configurações, conforme explicitado

acima. A distância de Procrustes é calculada pela soma de quadrados das distâncias dos marcos anatômicos entre duas formas. Assim, se uma configuração for determinada por 10 marcos anatômicos, a distância de Procrustes é a soma da distância do marco 1 da forma A (1-A) com o ponto 1 da forma B (1-B) ao quadrado, mais a distância entre 2-A e 2-B ao quadrado, mais a distância entre 3-A e 3-B ao quadrado e assim por diante, até a distância entre o ponto 10-A e 10-B ao quadrado.



**Figura 0.2:** Procedimentos de padronização de marcos anatômicos em asa de besouros para estudos em morfometria geométrica. **A:** Asa esquerda de *Canthon staigi* com 21 marcos anatômicos; **B:** Configuração média obtida após a padronização da configuração de 90 espécimes do gênero *Peltecanthon*. Os pontos em preto representam os marcos de cada configuração e os pontos em azul correspondem aos pontos médios.

O cálculo da distância de Mahalanobis segue mais ou menos a mesma lógica, com a diferença de que, para cada marco anatômico, os eixos cartesianos são rotacionados de modo a maximizar a variância dos pontos: numa nuvem de pontos (Figura 0.3A) são estimados dois eixos ortogonais, de modo que o eixo X seja o de maior variância e o centroide dos pontos marque a origem das coordenadas (Figura 0.3B). Depois disso, os eixos são escalonados de modo que possam ser traçadas elipses que contenham 68, 95 e 99,7% dos pontos (Figura 0.3C). A elipse é expandida para tornar proporcionais as medidas dos eixos X e Y (Figura 0.3D). A distância de Mahalanobis é então calculada pela raiz quadrada da soma do quadrado das distâncias.



**Figura 0.3:** Passos lógicos da maximização da variância dos pontos de cada marco anatômico entre diferentes formas. **A:** Considere que a nuvem de pontos corresponde ao ponto 1 de todas as configurações em estudo. **B:** A partir desta nuvem, é traçado o eixo X (em azul), de maior variância. Perpendicularmente ao eixo X, e passando pelo centroide dos pontos, é traçado o eixo Y. **C:** São traçadas então elipses que contenham 68% (1), 95% (2) e 99,7% (3) dos pontos. **D:** Depois os eixos são reposicionados e redimensionados, de modo que uma unidade em X tenha a mesma dimensão de uma unidade em Y. Explicação disponível em <http://stats.stackexchange.com/questions/62092/bottom-to-top-explanation-of-the-mahalanobis-distance>.

### ***Estudo dos padrões de coloração***

As cores observadas nos diversos organismos podem ser classificadas em dois tipos básicos: químicas ou estruturais. As cores químicas são baseadas em pigmentos e são presentes na maioria dos seres vivos, enquanto as estruturais resultam de efeitos óticos da luz incidente que difrata sobre as superfícies em forma de grade ou estruturas com certa ordenação nanométrica (Assis 2013).

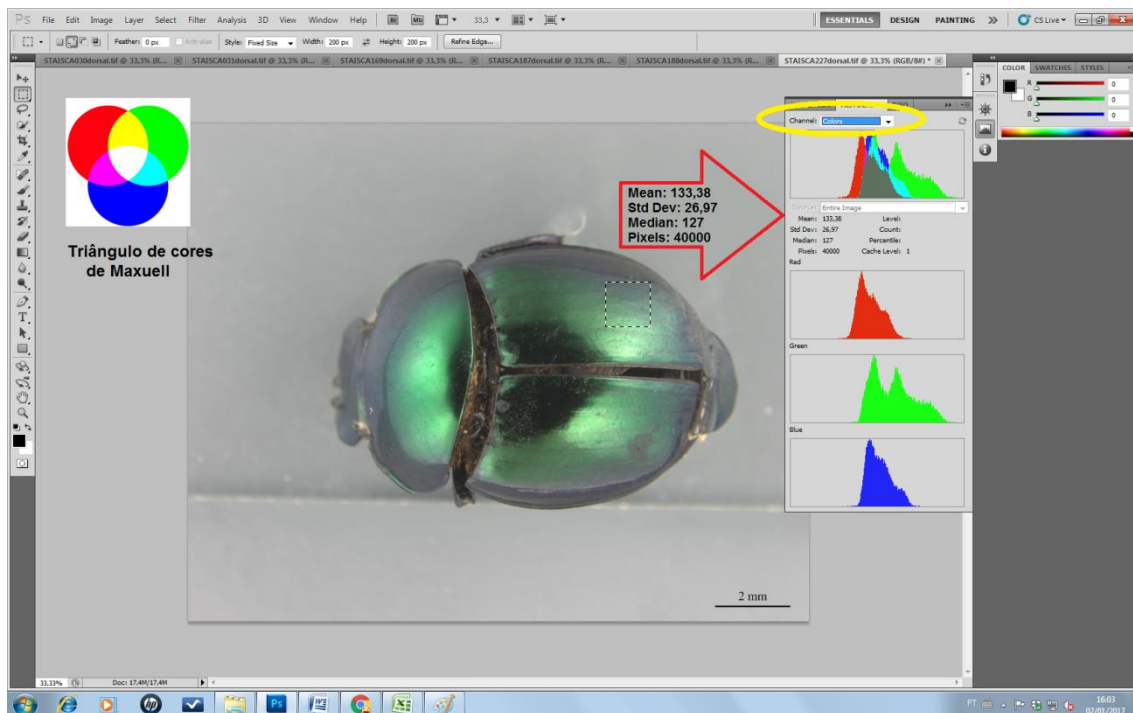
As cores estruturais podem ser classificadas em dois tipos: não-iridescentes e iridescentes. As cores não-iridescentes são causadas pela dispersão da luz em pequenas partículas ou reentrâncias presentes em uma superfície biológica (Kinoshita *et al.* 2008). Já as cores iridescentes decorrem da difração da luz em superfícies semelhantes a grelhas ou por interferência luminosa em camadas finas, como é o caso da coloração dos élitros dos besouros e das asas de borboletas (Luna *et al.* 2010).

O uso de padrões de coloração como uma informação taxonômica é impreciso e subjetivo, uma vez que se trata de uma característica qualitativa e subjetiva que pode ser alterada por uma série de fatores como altitude (Hodkinson 2005), temperatura ambiente (Adachi 2007), horário de atividade (Hernández 2002), proteção contra predação (Bezzerides *et al.* 2007), presença de simbioses (Tsuchida *et al.* 2010). Ainda assim, para muitas espécies de besouros a coloração tem sido utilizada arbitrariamente como critério de classificação (Nolasco-Soto *et al.* 2017, no prelo).

Apesar de ser em princípio qualitativos, os padrões de coloração podem ser transformados em caracteres quantitativos, o que permite a padronização e comparação de dados. A utilização de sistemas de cores como o modelo RGB pode ser utilizada como mais uma ferramenta de apoio às questões taxonômicas. O RGB é um sistema de cores aditivas composto de Vermelho (**Red**), Verde (**Green**) e Azul (**Blue**), amplamente utilizado em tecnologias como monitores de televisores e computadores, em câmeras digitais e *scanners*. Neste sistema, cada pixel (unidade da imagem) tem uma cor específica, dada pela intensidade (0 - 256) de cada um dos três canais de cores (Motoki *et al.* 2006).

Dados da intensidade de cada cor do sistema RGB podem ser acessados por programas de comerciais, como o Adobe PhotoShop, que calcula o número de pixels em

uma determinada área (que pode ser padronizada para todos os indivíduos) e determina um valor no sistema RGB para cada pixel (Figura 0.4). Com isso, é possível calcular um valor médio e um desvio padrão para cada cor (vermelho, verde e azul) na área em análise e comparar estes valores entre diferentes indivíduos ou entre indivíduos de diferentes espécies e assim avaliar possíveis diferenças.



**Figura 0.4:** Decomposição de cores pelo modelo RGB no programa Adobe Photoshop em área de 40000 pixels selecionada no élitro de besouro da espécie *Canthon staigi*. Destaque para o resultado médio dos componentes de RGB (seta vermelha): Mean – valor médio dos três canais; StdDev – desvio padrão dos três canais; Median: mediana dos três canais. Os mesmos índices podem ser obtidos individualmente para cada canal alterando-se a opção “Channel” indicada pela elipse amarela, selecionando a cor desejada.

## CAPÍTULO 1 – A sistemática de *Peltecanthon* (Scarabaeidae: Scarabaeinae) e o problema da manutenção de caracteres ancestrais

### 1.1. Introdução

*Canthon* (*Peltecanthon*) *staigi* (Pereira, 1953) é um besouro rola-bosta (Scarabaeinae) comumente encontrado em áreas de restinga de Mata Atlântica (Vieira *et al.* 2008). Geralmente dominante e muito abundante nos seus habitats (Costa *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2014), é considerado bioindicador da qualidade ambiental (Hernández *et al.* 2014). Por isso, o estudo dos efeitos da fragmentação e da ação antrópica sobre seus habitats naturais (Hernández *et al.* 2014; Campos & Almeida 2016; Ferreira-Neto *et al.* 2016) vem sendo alvo de interesse por pesquisadores preocupados com o papel desempenhado pela espécie na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas.

*Canthon staigi* pertence ao subgênero *Peltecanthon*, que contém ainda *Canthon auricollis* Redtenbacher, 1867 e *Canthon sulcatus* Castelnau, 1840. Originalmente descrito como gênero e abrigando apenas *C. staigi* e *C. sulcatus* (Pereira, 1953), *Peltecanthon* tem como diagnóstico o mesonoto com escutelo visível, que o diferencia dos demais *Canthon* (em que o escutelo é visível) (Halffter & Martínez 1967). Em 1977, Halffter & Martínez consideraram *Peltecanthon* como subgênero de *Canthon* incluindo *C. auricollis*, cujo escutelo não é visível mas apresenta a forma característica do subgênero.

A literatura relata a ocorrência de *Peltecanthon* do nordeste ao sul do Brasil e também na Argentina e Paraguai (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967, 1977). No Brasil, *C. staigi* ocorre em áreas de baixa altitude (Louzada *et al.* 1996) nos estados litorâneos da Paraíba ao Paraná, incluindo também Minas Gerais e Amazonas (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967, 1977). *Canthon sulcatus* coocorre com *C. staigi* em territórios desde o sul da Bahia até o Rio de Janeiro (Halffter & Martínez 1967). Uma estimativa aproximada da proporção entre as espécies foi feita por Halffter & Martínez (1967), que relatou a coleta de 20 *C. staigi* para cada um *C. sulcatus*. *Canthon auricollis* é o menos conhecido dos *Peltecanthon* e tem ocorrência na descrição original a ocorrência relatada somente como “Brasil” (Redtenbacher 1867). *Canthon staigi* e *C.*

*sulcatus* apresentam morfologia muito similar e compartilham os mesmos tipos de ambiente, hábitos, horário de atividade, além do mesmo padrão de coloração corporal, que as diferencia de *C. auricollis* (Halffter & Martínez 1967) que, ao contrário das espécies-irmãs, vem sendo encontrada em áreas mais montanhosas.

As relações filogenéticas entre as espécies de *Peltecanthon* foram pouco estudadas até então, se limitando às revisões apresentadas por Halffter & Martínez em 1966 e 1967, baseadas em caracteres morfológicos. Para o gênero *Canthon*, encontramos estudos de variação e sistemática baseados em morfologia (Medina 2000; Medina *et al.* 2003), delimitação de poucas espécies baseada em marcadores moleculares (Monaghan *et al.* 2005; Nolasco-Soto *et al.* 2017, no prelo), além da presença de algumas espécies em filogenias mais abrangentes (Monaghan *et al.* 2007; Tarasov & Dimitrov 2016).

Apesar de diferenciáveis morfologicamente por especialistas, *C. staigi* e *C. sulcatus* são facilmente confundíveis, além de compartilharem o mesmo ambiente e praticamente a mesma distribuição, o que leva ao questionamento a respeito da independência evolutiva entre os dois epítetos. Neste sentido, nós avaliamos a distribuição das três espécies de *Peltecanthon* utilizando a Coleção Zoológica da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) (SZMT-CEMT), cujo curador é o Dr. Fernando Vaz de Mello, especialista em Scarabaeinae, além de doações de espécimes feitas com outros pesquisadores. Nós também fizemos novas coletas. Com os espécimes obtidos, propusemos uma hipótese filogenética de *Peltecanthon* baseada em um gene mitocondrial e uma sequência nuclear, e avaliamos as diferenças morfométricas entre as três espécies utilizando ferramentas de morfometria geométrica. Estes estudos nos permitiram (i) ampliar o conhecimento a respeito da distribuição geográfica das três espécies e (ii) diferenciar *C. staigi* das outras duas espécies de *Peltecanthon* utilizando duas ferramentas independentes.

## 1.2. Material e métodos

### 1.2.1. Amostragem

A amostragem foi composta de exemplares coletados em campo, de exemplares provenientes da Coleção Zoológica da UFMT e de doações de exemplares por outros pesquisadores, preferencialmente coletados e acondicionados em álcool (condição ideal para obtenção de material genético de melhor qualidade).

As coletas foram feitas na estação chuvosa utilizando armadilhas do tipo *pitfall* iscadas com fezes humanas e contendo álcool combustível como solução mortífera (Szinwelski *et al.* 2012), expostas em campo durante 24-48 horas. Após a coleta, os besouros foram acondicionados em via úmida (tubos de congelamento com álcool etílico 96°GL e mantidos em freezer -20°C).

Os exemplares provenientes de Coleção Entomológica foram coletados com armadilhas do tipo *pitfall* iscadas com fezes humanas e contendo como solução mortífera uma combinação de água-sabão-sal, expostas em campo durante 48 horas. Após a coleta, os besouros foram armazenados em álcool etílico até serem destinados à triagem, sendo acondicionados em mantas de algodão para secagem em estufa e posterior montagem em alfinete entomológico (via seca). A maioria dos espécimes estudados encontrava-se nas mantas de algodão.

A identificação até o nível específico foi feita com base na literatura (Redtenbacher 1867; Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967) e por comparação com exemplares da coleção da UFMT.

### 1.2.2. Análises das relações filogenéticas

#### 1.2.2.1. Escolha dos genes

Foi escolhido como marcador mitocondrial o gene que codifica a subunidade I da Citocromo Oxidase (COI), amplificado utilizando-se os *primers* universais Pat (5'-

TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') e Jerry (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') (Simon *et al.* 1994), e como marcador nuclear, o segundo espaçador transcrito interno (ITS2) do rDNA, amplificado utilizando-se os *primers* ITS2-F (5'-GGGTTCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS2-R (5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3') (Navajas *et al.* 1998). A escolha desses marcadores foi feita em função das sequências de *Canthon* e outros Scarabaeinae existentes no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 1.2.2.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Para obtenção de material genético de qualidade, foram utilizados somente exemplares coletados e acondicionados em álcool. De cada amostra, no máximo duas pernas (posteriores e/ou medianas) do mesmo lado do corpo foram retiradas para extração do DNA, que foi feita utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega).

A amplificação do DNA por PCR foi realizada em reações com volume final de 25µL consistindo de: MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); tampão (1x-Promega); dNTP (0,2mM cada); *primer* (0,2µM cada); Taq polimerase (1,25U-Promega) e DNA molde (2µL). As reações de PCR foram submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação inicial por 5' a 94°C; 10 ciclos de *touch down*, onde a temperatura de *annealing* diminuiu 1°C a cada ciclo, consistido de desnaturação de 1' a 94°C, 1'45" para *annealing* (55-45°C); 1'45" de extensão a 72°C; 30 ciclos de desnaturação com 1' a 94°C, 1'45" a 45°C para *annealing* e extensão de 1'45" a 72°C; e uma extensão final por 5' a 72°C.

O resultado da amplificação do DNA foi observado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed<sup>TM</sup> (Uniscience). Quando a amplificação do DNA resultou em bandas duplas (que foi o caso de algumas amostras do ITS2), foi feito o recorte e purificação dessas bandas para selecionar somente a banda de interesse para sequenciamento. A purificação foi feita utilizando-se o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

A purificação e o sequenciamento dos produtos amplificados foram realizados pelo método Sanger, utilizando o serviço de sequenciamento da empresa Macrogen, na

Coreia (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Para cada amostra foi produzida uma sequência *forward* e uma *reverse* a fim de obter uma sequência consenso. Para confirmar se as sequências correspondem à região alvo e ao grupo taxonômico de interesse, foram realizadas buscas no banco de dado NCBI, por meio do programa BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

### 1.2.2.3. Análises filogenéticas

A qualidade dos eletroferogramas obtidos após a reação de sequenciamento foi avaliada com o auxílio do programa CodonCode Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation) e apenas as que apresentaram boa qualidade (ausência de picos duplos nos eletroferogramas) foram utilizadas nas análises subsequentes.

As sequências foram alinhadas pelo método ClustalW (Thompson *et al.* 1994), disponível no pacote MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) e refinadas por inspeção visual. Como o COI é codificador de aminoácidos, as sequências foram traduzidas para a sequência de aminoácidos correspondente e alinhadas, com subsequente reversão para as sequências de nucleotídeos. Esta etapa requer o posicionamento de todas as sequências no frame de leitura e todas as sequências com indícios de *numts* (*stop codons* prematuros, inserções ou deleções não múltiplas de 3 – Cristiano *et al.* 2012) foram retiradas da análise.

Para inferir a hipótese filogenética baseada unicamente no COI, utilizamos como *outgroups* dois exemplares de *Canthon* (*Goniocanthon*) *smaragdulus* (Fabricius, 1781), subgênero próximo de *Peltecanthon* (Halfpter & Martínez 1967) e cujas sequências foram obtidas em nosso laboratório com o mesmo protocolo utilizado para os *Peltecanthon*; e um exemplar de *Temnoplectron* sp. (Deltachilini), cuja sequência foi obtida no banco de dados *Genbank* (Número de Acesso KF801975.1).

Para a hipótese baseada no ITS2, utilizamos como *outgroups* um exemplar de *C. smaragdulus*, cuja sequência foi obtida em nosso laboratório com o mesmo protocolo utilizado para *Peltecanthon* e um exemplar de *Circellium bacchus* (Fabricius, 1781)

(Deltachilini), cuja sequência foi obtida no banco de dados *Genbank* (Número de Acesso JN657160.1).

#### ***1.2.2.4. Seleção de modelos***

A escolha de modelos de substituição para cada árvore (as duas árvores baseadas nos genes separados e a árvore concatenada) foi feita de forma independente. Utilizamos o programa PartitionFinder2 (Lanfear *et al.* 2016) para definir o melhor modelo de substituição para cada posição do códon. Para a árvore concatenada, utilizamos o PartitionFinder2 para inferir um modelo para cada posição do códon do COI em um quarto modelo para o ITS2.

#### ***1.2.2.5. Inferência Filogenética***

Uma vez obtidos os modelos a serem utilizados em cada inferência filogenética, utilizamos o programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) para otimizar a topologia, os tamanhos de ramos e os valores dos parâmetros de cada modelo envolvido em cada análise pela Inferência Bayesiana (Yang & Ranalla 1997). Em cada uma das três análises, o MrBayes percorreu o espaço de possibilidades ao longo de 50 milhões de passos, dos quais 25% foram eliminados para a obtenção de uma árvore consenso.

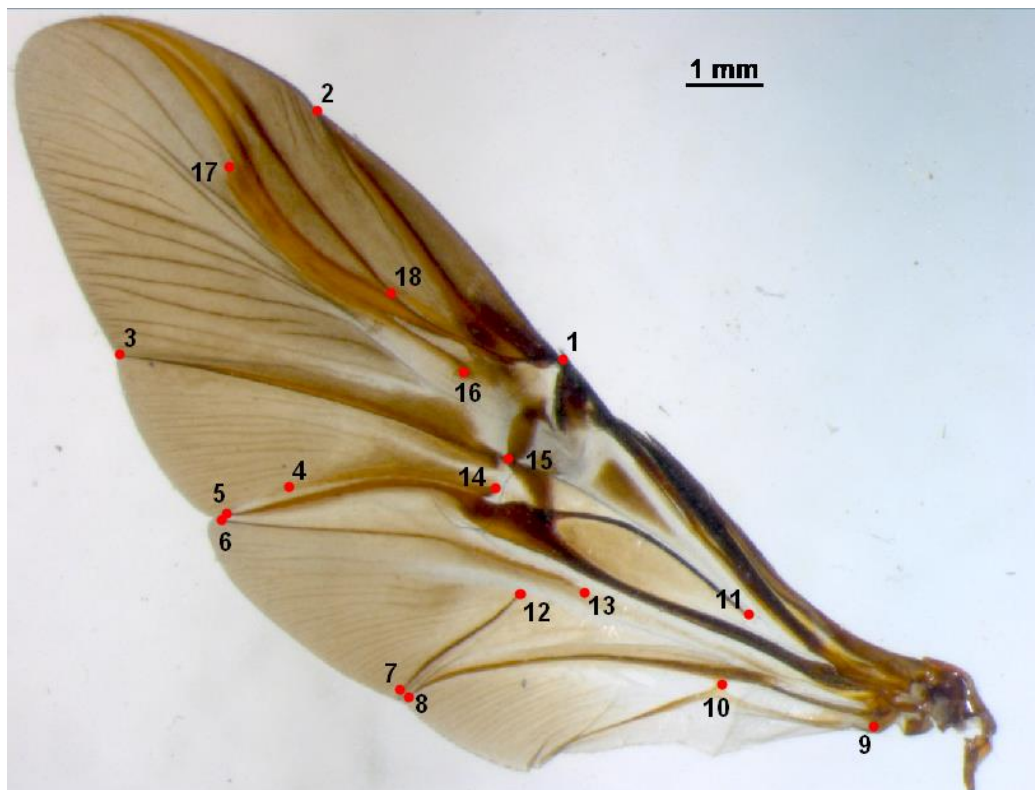
### ***1.2.3. Morfometria geométrica***

#### ***1.2.3.1. Seleção e preparo do material***

Para as análises de morfometria geométrica da asa foram utilizados exemplares provenientes de coletas em campo e de coleção entomológica. Os indivíduos foram dissecados para retirada da genitália e identificação do sexo, já que a espécie não apresenta dimorfismo sexual na morfologia corporal. As asas membranosas esquerdas

foram excisadas em sua base, imersas em solução de água e detergente a 60°C para torná-las mais flexíveis e possibilitar sua montagem entre lâminas de vidro para microscopia, que garantem que todas as asas sejam fotografadas em um mesmo plano, permitindo a comparação entre elas. O restante do corpo de cada espécime voltou para seu acondicionamento original (álcool comercial -20°C ou manta de algodão), sendo identificado com um código para posterior acesso à informação individualizada.

Uma vez montadas entre as lâminas, as asas foram fotografadas em estereomicroscópio ZEISS SteREO Discovery V.20 acoplado de câmera digital ZEISS AxioCam MRc e as imagens foram obtidas pelo programa ZEISS Axio Vision Release 4.8.2 (<https://www.zeiss.com/corporate/int/home.html>), anotando-se a escala. As fotos digitalizadas foram convertidas para a extensão .tps no programa TpsUtil v. 1.7 (Rohlf 2016). As imagens foram importadas para o programa TpsDig versão 2.26 (Rohlf 2016) para marcação dos marcos anatômicos (total de 18 – Figura 1.1) e padronização da escala. Os marcos anatômicos são pontos que devem ser reconhecíveis em todas as asas em estudo. As análises morfométricas partem do pressuposto de que estes pontos são homólogos e, portanto, comparáveis entre todos os indivíduos.



**Figura 1.1:** Asa posterior esquerda de *Canthon staigi* com 18 marcos anatômicos homólogos entre as três espécies de *Peltecanthon*.

### **1.2.3.2. Análises morfométricas**

As amostras foram categorizadas por sexo e por espécie. Para cada imagem foram feitas duas cópias e, em cada uma delas, os marcos anatômicos foram tomados independentemente. Esse procedimento permitiu quantificar o erro de marcação dos marcos anatômicos pela análise de variância ANOVA comparando-se a diferença entre as réplicas, que foi feita no programa MorphoJ 1.06d (Klingenberg 2011).

Em seguida, utilizando o programa MorphoJ, foi feita a inspeção e eliminação dos *outliers* e gerada a matriz de variância-covariância dos resíduos. Para atender aos pressupostos de alguns testes utilizados com relação à normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Normalidade Multivariada no programa PAST 3.14 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Dentro de cada espécie, investigamos se há dimorfismo sexual na forma da asa pela Análise de Função Discriminante com 10.000 permutações considerando as distâncias de Procrustes e Mahalanobis (significância 0,05).

A variabilidade na forma da asa das diferentes espécies foi acessada pela Análise dos Componentes Principais, com gráficos apresentando elipses com 90% de confiança da média agrupando cada espécie. Para verificar se há diferenças na forma das asas entre as três espécies de *Peltecanthon*, foi utilizada a Análise de Variáveis Canônicas com 10.000 permutações. Utilizando a Análise de Função Discriminante, calculamos as distâncias par-a-par de Mahalanobis e de Procrustes (significância 0,05), com 10.000 permutações, a fim de determinar a significância estatística das diferenças de formato médio entre as diferentes espécies. O papel do Tamanho do Centroide na variação entre as espécies foi analisado por ANOVA no MorphoJ (significância 0,05).

## **1.3. Resultados**

### **1.3.1. Amostragem**

A Tabela 1.1 mostra o número de espécimes de cada espécie obtidos em expedição de coleta, os presentes na Coleção Zoológica da UFMT e os obtidos por meio

de doações de outros pesquisadores. A área de ocorrência de *C. staigi* foi a mais ampla dentro da amostragem, abrangendo os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e totalizando 709 exemplares. Para *C. sulcatus*, a distribuição limitou-se a Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, totalizando 161 exemplares. Para *C. auricollis*, somente foi registrada ocorrência nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, totalizando 42 exemplares.

As coletas em campo realizadas por nossa equipe se deram nas seguintes localidades: Santa Teresa-ES, na Estação Biológica de Santa Lúcia; Porto Seguro-BA, no Parque Nacional do Pau Brasil; Sooretama -ES, na área particular da Reserva Natural da Vale; Linhares-ES, na Reserva Biológica de Comboios, situada no distrito de Regência; Guarapari-ES, no Parque Estadual Paulo César Vinha; Marliéria-MG, no Parque Estadual do Rio Doce; São Francisco de Itabapoana-RJ, na Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba; no Rio de Janeiro-RJ, no Parque Estadual da Pedra Branca; em propriedade particular no município de Caraguatatuba-SP.

A coocorrência de *C. staigi* e *C. sulcatus* foi confirmada em coletas recentes nas seguintes localidades: Porto Seguro-BA, Sooretama-ES, Linhares-ES, Guarapari-ES e Marliéria-MG. Nestes locais, a proporção de indivíduos coletados variou entre as espécies, sendo ora *C. staigi* a mais abundante, ora *C. sulcatus*. Mas essas espécies se mostraram sempre muito abundantes nos locais em que foram encontradas. Dentro de cada local de coleta não foi possível diferenciar as duas espécies pela sua coloração.

Alguns exemplares de *C. staigi* e *C. sulcatus* foram observados e coletados ainda vivos sobre a vegetação em caminhadas diurnas, ou quando se dava o preparo da armadilha para montagem devido ao odor exalado pelas fezes em manipulação, conforme descrição do comportamento de “empoleirar-se” relatado por Salomão *et al.* (2016). Foi comum observar que os primeiros indivíduos a chegarem ao *pitfall*, algumas vezes com menos de cinco minutos de instalação da armadilha, eram de espécimes de *Peltecanthon* ou de *Goniocanthon* que se encontravam geralmente empoleirados sobre folhas de Heliconiaceae. Isso foi mais comum em áreas sombreadas e úmidas dos fragmentos amostrados, independente de se tratar de floresta arbórea (Porto Seguro-BA, Sooretama-ES, Marliéria-MG; São Francisco de Itabapoana-RJ e Rio de Janeiro-RJ) ou de floresta de restinga (Linhares-ES, Guarapari-ES, Caraguatatuba-SP).

Em nossas coletas, a espécie *C. auricollis* somente foi encontrada no município de Santa Tereza-ES, na Estação Biológica de Santa Lúcia, um fragmento de Floresta Ombrófila Densa de 440ha situada entre 660 e 780m de altitude. A despeito de um grande esforço amostral em diferentes partes do fragmento, somente seis indivíduos foram coletados em *pitfall* e nenhum exemplar foi coletado vivo.

No município de Sooretama-ES, Reserva Natural da Vale, Estrada Cinco Folhas, encontramos 19 espécimes de *C. staigi* e dois de *C. sulcatus* se alimentando de uma carcaça de tatu de espécie não identificada. O tatu aparentemente foi predado por outro animal e já se apresentava em estágio de decomposição avançado, constituindo-se somente de carcaça úmida sobre a folhagem próxima à trilha (Figura 1.2). Na mesma carcaça encontramos ainda oito exemplares de *C. smaragdulus*.



**Figura 1.2:** Registro de carcaça de tatu (espécie não identificada) colonizada por *Canthon staigi*, *C. sulcatus* e *C. smaragdulus* em trilha na Estrada Cinco Folhas, Reserva Natural da Vale, Sooretama-ES, em fevereiro de 2015. Foto: Tércia Vargas

**Tabela 1.1:** Amostragem de *Canthon auricollis*, *Canthon staigi* e *Canthon sulcatus*. Localidades de ocorrência separadas por espécie. Ano da última coleta registrada. Número total de exemplares por localidade. Procedência do material: CO – coleção, CT – coleta ou DO – doação; doadores de exemplares: \*1 Profa. Rita de Cássia Moura, Universidade do Pernambuco; \*2 Cristiane Maria Queiroz da Costa, Universidade Federal de Lavras; \*3 Rafael Vieira Nunes, Universidade Federal do Mato Grosso. Solução mortífera utilizada na coleta: ADS – água-detergente-sal ou ALC – álcool. Acondicionamento após triagem e identificação: VS – exemplares acondicionados em via-seca (manta ou alfinete entomológico) ou VU – exemplares acondicionados em via-úmida (álcool). Amostragem utilizada para análises filogenéticas (para COI e ITS2 ou concatenada). Amostragem utilizada para análises morfométricas (machos e fêmeas).

| Localidades de ocorrência                          | Ano da última coleta | Número de exemplares | Procedência / solução mortífera / acondicionamento | Análises filogenéticas (COI / ITS2 / concatenada) | Análises morfométricas (macho/fêmea) |
|----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b><i>Canthon auricollis</i></b>                   |                      |                      |                                                    |                                                   |                                      |
| Marechal Floriano-ES                               | 2003                 | 1                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Santa Teresa-ES (Estação Biológica de Santa Lúcia) | 2015                 | 6                    | CT/ALC/VU                                          | 2 / 4 / 4                                         | 5 / 1                                |
| Barão de Cocais-MG                                 | 2011                 | 18                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | 2 / 12                               |
| Mariana-MG                                         | 2011                 | 2                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Rio Acima-MG                                       | 2010                 | 1                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Vargem Alta-MG                                     | 2007                 | 14                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| TOTAL DE EXEMPLARES                                |                      | 42                   |                                                    |                                                   |                                      |
| <b><i>Canthon staigi</i></b>                       |                      |                      |                                                    |                                                   |                                      |
| João Pessoa-PB                                     | ?                    | 2                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Mamanguape-PB                                      | 2002                 | 4                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Rio Tinto-PB                                       | 2002                 | 7                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Aldeia-PE                                          | ?                    | 10                   | DO*1/ALC/VU                                        | 9 / 4 / 4                                         | -                                    |
| Araçoiaba-PE                                       | 2010                 | 12                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Caruaru-PE                                         | 2007                 | 1                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Pesqueira-PE                                       | ?                    | 10                   | DO*1/ALC/VU                                        | 5 / 6 / 6                                         | -                                    |
| REBIO de Salinho-PE                                | 2013                 | 4                    | DO*2/ADS/VS                                        | -                                                 | -                                    |
| Ibateguara-AL                                      | 2008                 | 7                    | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Estância-SE                                        | 2013                 | 4                    | DO*2/ADS/VS                                        | -                                                 | -                                    |
| Porto Seguro-BA (PARNA do Pau Brasil)              | 2015                 | 1                    | CT/ALC/VU                                          | 5 / 1 / 1                                         | -                                    |
| Porto Seguro                                       | 2012                 | 17                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Itabuna-BA                                         | 2003                 | 14                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Alcobaça-BA                                        | 2007                 | 40                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Prado-BA                                           | 2007                 | 24                   | CO/ADS/VS                                          | -                                                 | -                                    |
| Sooretama-ES (Reserva Natural da Vale)             | 2015                 | 56                   | CT/ALC/VU                                          | 9 / 4 / 4                                         | 19 / 14                              |

|                                                                           |      |     |             |            |   |
|---------------------------------------------------------------------------|------|-----|-------------|------------|---|
| Linhares-ES (REBIO de Comboios)                                           | 2015 | 30  | CT/ALC/VU   | -          | - |
| Linhares-ES                                                               | 2012 | 79  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Guarapari-ES (Parque Estadual Paulo César Vinha)                          | 2015 | 2   | CT/ALC/VU   | -          | - |
| Anchieta-ES                                                               | 2010 | 24  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Cachoeiro do Itapemirim-ES                                                | 1997 | 34  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Floresta-ES                                                               | 2007 | 12  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Marataízes-ES                                                             | 2007 | 31  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Presidente Kenedy-ES                                                      | 2007 | 15  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| São Mateus-ES                                                             | 1996 | 8   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Vitória-ES                                                                | 2004 | 8   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Açucena-MG                                                                | 1995 | 2   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Ipatinga-MG                                                               | 1987 | 4   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Marliéria-MG (Parque Estadual do Rio Doce)                                | 2016 | 65  | CT/ALC/VU   | 10 / 5 / 5 | - |
| Marliéria-MG (Parque Estadual do Rio Doce)                                | 2000 | 2   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Cachoeiras de Macacu-RJ                                                   | 2013 | 2   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| São Francisco do Itabapoana-RJ (Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba) | 2015 | 15  | CT/ALC/VU   | 10 / 5 / 5 | - |
| Rio de Janeiro-RJ (Parque Estadual da Pedra Branca)                       | 2015 | 21  | CT/ALC/VU   | -          | - |
| Rio de Janeiro-RJ                                                         | 2010 | 44  | CO/ADS/VS   | 7 / 2 / 2  | - |
| Cabo Frio-RJ                                                              | 1990 | 6   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Itaguaí-RJ                                                                | 1996 | 2   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Jacarepaguá-RJ                                                            | 1994 | 3   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Mangaratiba-RJ                                                            | 1999 | 3   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Marapendi-RJ                                                              | 1987 | 1   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Miguel Pereira-RJ                                                         | 1995 | 1   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Caraguatatuba-SP                                                          | 2012 | 2   | CT/ALC/VU   | -          | - |
| Bertioga-SP (RPPN SESC Bertioga)                                          | 2014 | 9   | DO*3/ALC/VU | 2 / 1 / 1  | - |
| Bertioga-SP (RPPN SESC Bertioga)                                          | 2014 | 26  | CO/ADS/VS   | 4 / 4 / 4  | - |
| Parque Estadual da Serra do Mar-SP (Núcleo Santa Virgínia)                | 2012 | 2   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Parque Estadual da Serra do Mar-SP (Núcleo Caraguatatuba)                 | 2012 | 42  | CO/ADS/VS   | -          | - |
| Picinguaba-SP                                                             | 1999 | 1   | CO/ADS/VS   | -          | - |
| TOTAL DE EXEMPLARES                                                       |      | 709 |             |            |   |

*Canthon sulcatus*

|                                                  |      |     |           |           |       |
|--------------------------------------------------|------|-----|-----------|-----------|-------|
| Trapiche-PE                                      | 2010 | 16  | CO/ADS/VS | 1 / 0 / 0 | 1 / 1 |
| Porto Seguro-BA (PARNA do Pau Brasil)            | 2015 | 6   | CT/ALC/VU | 2 / 1 / 1 | -     |
| Porto Seguro-BA                                  | 2004 | 3   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Santa Cruz de Cabralia-BA                        | 2007 | 10  | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Igrapiuna-BA                                     | 2010 | 3   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Simões Filho-BA                                  | 1987 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Sooretama-ES (Reserva Natural da Vale)           | 2015 | 8   | CT/ALC/VU | 2 / 0 / 0 | 6 / 3 |
| Linhares-ES (REBIO de Comboios)                  | 2015 | 19  | CT/ALC/VU | -         | 4 / 7 |
| Linhares-ES                                      | 2012 | 6   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Guarapari-ES (Parque Estadual Paulo César Vinha) | 2015 | 22  | CT/ALC/VU | 2 / 0 / 0 | 5 / 6 |
| Barra do Jucu-ES                                 | 1985 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Presidente Kenedy-ES                             | 2007 | 3   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Vitória-ES                                       | 1986 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Leopoldina-MG                                    | 1999 | 2   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Marliéria-MG (Parque Estadual do Rio Doce)       | 2014 | 38  | CT/ALC/VU | 2 / 0 / 0 | -     |
| Marliéria-MG (Parque Estadual do Rio Doce)       | 2001 | 8   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Recreio-MG                                       | 2000 | 9   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Viçosa-MG                                        | 1994 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Campos dos Goytacazes-RJ                         | 2008 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Rio das Ostras-RJ                                | 2007 | 1   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| Rio de Janeiro-RJ                                | 1999 | 2   | CO/ADS/VS | -         | -     |
| TOTAL DE EXEMPLARES                              |      | 161 |           |           |       |

### **1.3.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA**

A escolha dos exemplares que compuseram as análises moleculares partiu da lista de ocorrência (Tabela 1.1), independentemente da forma de coleta e acondicionamento. Após um período de testes e padronização dos protocolos de extração de DNA, utilizando *kits* comerciais de diferentes marcas e também protocolos manuais, observamos que o sucesso na extração de material genético de exemplares provenientes de coleções entomológicas (seja conservado em manta ou em alfinete entomológico) foi pouco significativo. Dessa forma, optamos por utilizar somente exemplares provenientes de coleta em álcool, que além de ser a melhor condição para preservação do DNA, eram os exemplares mais recentes da amostragem, garantindo assim a melhor qualidade possível dos resultados.

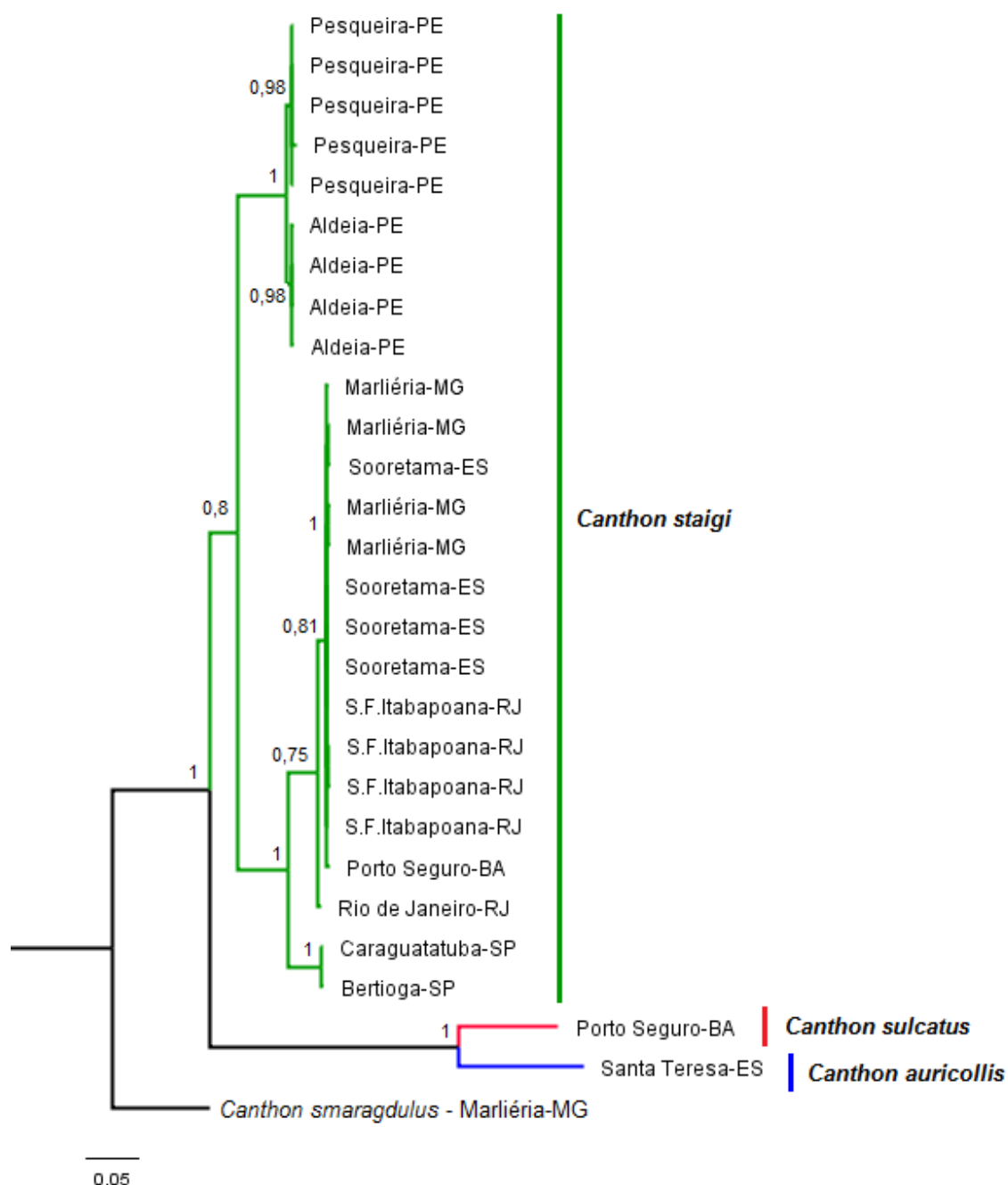
Os marcadores moleculares estudados também responderam diferentemente à amplificação por PCR. Após padronização do protocolo de amplificação para o COI, o gel de agarose passou a apresentar bandas simples, claras e bem evidentes, com tamanho correspondente ao esperado comparado ao *ladder*. Para o ITS2, no entanto, a amplificação resultou por vezes em um padrão de bandas duplas (uma na altura esperada do ITS2 – aproximadamente 600 bp – e outra menor, na altura aproximada de 400 bp). O sequenciamento destas bandas e posterior comparação no BLASTn revelou que a banda maior (671 bp) é homóloga a sequências de ITS2 obtidas em outros Coleoptera, enquanto a menor (433 bp) é homóloga a sequências obtidas em fungos. Diante disso, passamos a purificar a banda maior (excisão do gel) para a reação de sequenciamento.

**Figura 1. 3:** Localidades de ocorrência de *Canthon auricollis*, *Canthon staigi* e *Canthon sulcatus* amostradas nas análises filogenéticas com COI e ITS2.

### 1.3.3. Análises filogenéticas

A Figura 1.4 mostra a hipótese filogenética baseada nas sequências de COI (978 sítios) e ITS2 (492 sítios) concatenadas. Só foram incluídas as sequências de espécimes para as quais conseguimos as duas sequências com qualidade. A árvore contém 32 exemplares de *C. staigi*, um de *C. sulcatus*, quatro de *C. auricollis* e um *outgroup*, *C. smaragdulus*.

Esta hipótese filogenética apresentou a separação entre as três espécies de *Peltecanthon*. *Canthon staigi* aparece como uma linhagem monofilética (probabilidade posterior PP = 1,0), claramente independente das outras duas espécies, *C. sulcatus* e *C. auricollis*, que apareceram como espécies irmãs (PP = 0,79). As topologias obtidas com as análises em separado do COI e ITS2 resultaram no mesmo padrão de agrupamento de *C. auricollis* com *C. sulcatus* (Figuras 3.1 e 3.2 do Anexo).



**Figura 1.4:** Hipótese filogenética concatenada dos marcadores COI e ITS2 obtida por Inferência Bayesiana (50 milhões de gerações com *burnin* de 25%) para espécies do subgênero *Peltecanthon*. Os valores ao lado dos nós ancestrais correspondem à probabilidade posterior (PP). As sequências de COI e ITS2 de *Canthon smaragdulus* foram utilizadas como *outgroup*. Em verde está representado o clado contendo os exemplares da espécie *Canthon staigi*, em vermelho *Canthon sulcatus* e em azul *Canthon auricollis*. Os nós terminais foram identificados segundo o local de coleta de cada espécime.

#### 1.3.4. Análises morfométricas

A amostragem utilizada para análise morfométrica está apresentada na Tabela 1.1. Não foram observados *outliers* na amostra. O erro de digitação na tomada dos

marcos anatômicos não foi significativo (Tabelas 3.1 e 3.2 do Anexo) e os 18 marcos anatômicos em estudo foram aprovados na análise Normalidade Multivariada (Tabela 3.3 do Anexo).

A análise intraespecífica do dimorfismo sexual revelou que não há diferenças significativas na forma das asas de machos e fêmeas em espécies de *Peltecanthon* (Tabela 1.2). Assim, as análises multivariadas seguintes consideraram machos e fêmeas num único conjunto de dados.

**Tabela 1.2:** Análise de Função Discriminante baseada nas distâncias de Mahalanobis e de Procrustes para comparação da forma das asas de machos e fêmeas em espécies de *Peltecanthon*; significância de 0,05.

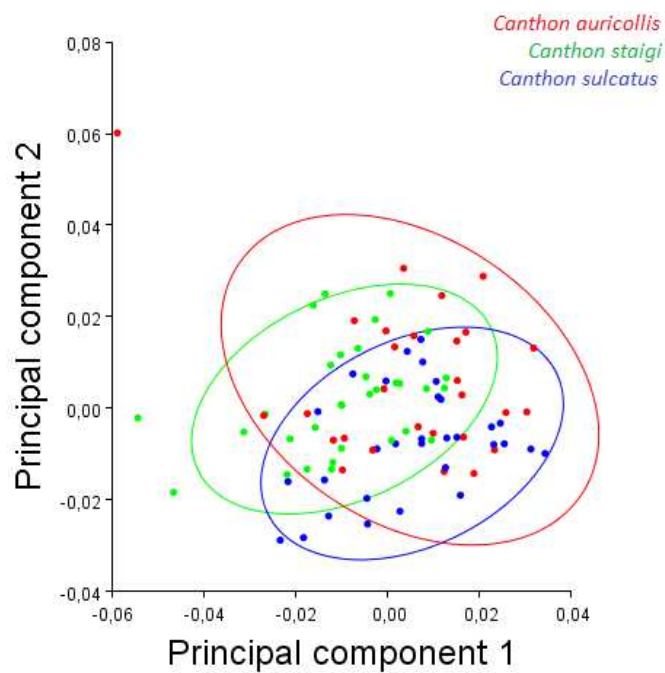
| Espécie                   | Distância de Mahalanobis | <i>p</i> -valor | Distância de Procrustes | <i>p</i> -valor |
|---------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Canthon auricollis</i> | 4,5825                   | 0,3648          | 0,0177                  | 0,2443          |
| <i>Canthon staigi</i>     | 13,1347                  | 0,1528          | 0,0118                  | 0,4435          |
| <i>Canthon sulcatus</i>   | 8,2988                   | 0,4285          | 0,0158                  | 0,0600          |

A análise de Componentes Principais indicou uma sobreposição das espécies no espaço multivariado (Figura 1.5). Os dois primeiros eixos principais respondem por apenas 39,68% da variação na forma das asas (PC1=23,89% e PC2=15,79%).

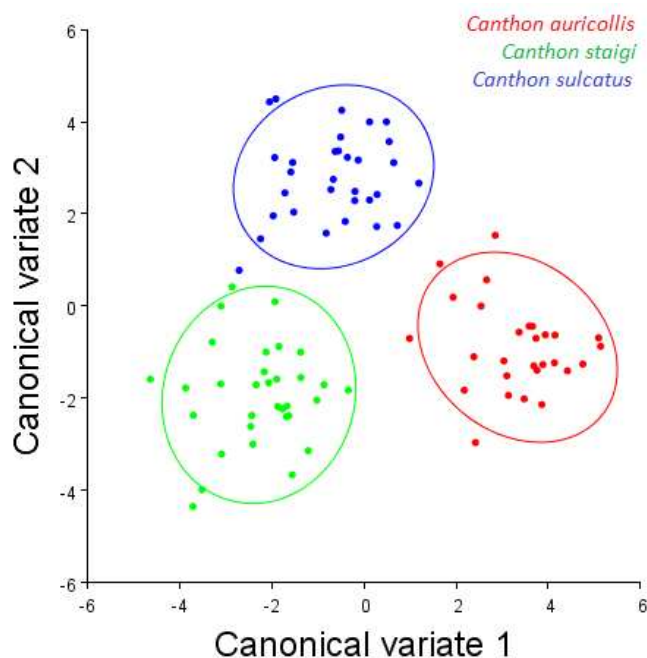
A análise das Variáveis Canônicas indicou uma clara separação entre as espécies de *Peltecanthon* (Figura 1.6). O primeiro eixo canônico (CV1) explicou 56,05% da variação na forma e separou claramente as espécies *C. auricollis* e *C. staigi*. O segundo eixo canônico (CV2) explicou os outros 43,95% da variação e separou *C. sulcatus* das outras espécies.

A análise de Função Discriminante mostrou a separação entre as espécies com valores significativos tanto para a distância de Mahalanobis como para a de Procrustes (Tabela 1.3). Independente do tipo de distância considerada, o valor da distância entre *C. auricollis* e *C. sulcatus* foi menor que entre qualquer uma delas e *C. staigi*.

A análise de variância ANOVA baseada no tamanho do centroide comparando as espécies não revelou diferença significativa, mostrando que esse componente não tem participação na explicação das diferenças observadas entre elas ( $F=1,33$ ;  $p=0,2698$ ).



**Figura 1.5:** Análise de Componentes Principais da morfometria da asa posterior de espécies de *Peltecanthon*: PC1 x PC2 das três espécies *Canthon auricollis*, *C. staigi* e *C. sulcatus* em elipses com 90% de intervalo de confiança.



**Figura 1.6:** Análise de Variáveis Canônicas da morfometria da asa posterior de espécies de *Peltecanthon*: CV1 x CV2 apresentando três espécies *Canthon auricollis*, *C. staigi* e *C. sulcatus*, em elipses com 90% de intervalo de confiança.

**Tabela 1.3:** Análise de Função Discriminante baseada nas distâncias de Mahalanobis e de Procrustes para comparação da forma das asas de espécies de *Peltecanthon*. Diagonal inferior: valores de distância; diagonal superior: *p*-valor, significância 0,05.

|                      | Distância de Mahalanobis |                  |                    | Distância de Procrustes |                  |                    |
|----------------------|--------------------------|------------------|--------------------|-------------------------|------------------|--------------------|
|                      | <i>C. auricollis</i>     | <i>C. staigi</i> | <i>C. sulcatus</i> | <i>C. auricollis</i>    | <i>C. staigi</i> | <i>C. sulcatus</i> |
| <i>C. auricollis</i> | -                        | <0,0001          | <0,0001            | -                       | <0,0001          | 0,0002             |
| <i>C. staigi</i>     | 7,0135                   | -                | <0,0001            | 0,0235                  | -                | <0,0001            |
| <i>C. sulcatus</i>   | 6,0660                   | 6,3690           | -                  | 0,0184                  | 0,0238           | -                  |

#### 1.4. Discussão

Neste trabalho, nós ampliamos o conhecimento a respeito da distribuição geográfica das três espécies de *Peltecanthon* e apresentamos os resultados dos estudos molecular e morfométrico que permitem diferenciar claramente *C. staigi* das outras duas espécies. Estes resultados são fundamentais para embasar estudos posteriores a respeito da ecologia, distribuição e relações filogeográficas de *C. staigi*, que, apesar de morfologicamente muito semelhante a *C. sulcatus*, compõe uma linhagem filogenética independente.

A compilação das coletas feitas ao longo do tempo e depositadas na Coleção Zoológica da UFMT, junto com coletas feitas por outros grupos de pesquisa e as realizadas neste trabalho, não reflete a distribuição registrada na literatura para as três espécies de *Peltecanthon*. Segundo a literatura, *C. staigi* ocorre da Paraíba ao Paraná, tendo sido encontrado também no estado do Amazonas, na Argentina e no Uruguai. Apesar de terem sido realizadas coletas em toda esta distribuição, não há registros desta espécie no Amazonas ou ao sul de São Paulo entre os Scarabaeinae depositados na Coleção Zoológica da UFMT. As amostras obtidas por doação de outros pesquisadores tampouco contêm espécimes nestas localidades, o que justifica a ausência de novas coletas nas mesmas. Além disso, buscas na literatura não indicaram qualquer ocorrência mais recente do que as citações de Halffter & Martínez (1967).

Por outro lado, este trabalho ampliou a distribuição conhecida de *C. sulcatus*, que além dos estados onde foi previamente observado (Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro), também inclui registros em Pernambuco e Minas Gerais. *Canthon auricollis*, cuja ocorrência anteriormente se limitava ao “Brasil” (Redtenbacher 1867), foi

encontrado em algumas localidades de altitude mais elevada (acima de 500 m) nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

*Canthon staigi* e *C. sulcatus* são descritas como espécies de hábito coprófago, com preferência por fezes humanas e frescas, com horário de atividade diurno (Halffter & Martínez 1967). Essas informações se confirmaram nas coletas realizadas por nossa equipe. A observação de exemplares colonizando uma carcaça de tatu evidencia a capacidade que estas espécies têm de utilizar os recursos disponíveis. A necrofagia é um hábito alimentar comum em Scarabaeinae, embora não tenha sido relatado em *C. staigi* ou *C. sulcatus*.

A coocorrência de *C. staigi* e *C. sulcatus* foi confirmada nas coletas realizadas em Porto Seguro-BA (um *C. staigi* e seis *C. sulcatus* – 1st/6su); Sooretama (56st/8su), Linhares (30st/19su) e Guarapari-ES (2st/22su); e Marliéria-MG (65st/38su). Halffter & Martínez (1967) também relataram a coocorrência destas duas espécies, mas numa proporção de 20st/1su em uma amostragem no norte do estado do Espírito Santo. Nossos resultados revelaram que este não é um padrão geral, uma vez que em algumas localidades a população de *C. sulcatus* se sobressaiu acentuadamente sobre *C. staigi*. Esta discrepância pode estar associada à época de coleta em cada localidade, pois apesar de todas as coletas terem sido realizadas na estação chuvosa, pode haver alguma substituição de espécies ao longo da estação chuvosa que não foi observada. Pode ainda haver algum fator intrínseco a cada espécie que a torne mais bem adaptada a alguns tipos de ambiente, como por exemplo, diferentes condições de adaptação ao estresse hídrico. Esse poderia ser o caso de *C. sulcatus*, por exemplo, que em algumas localidades no Pernambuco foi mais abundante na estação seca do que na úmida e enormemente mais abundante do que *C. staigi*, numa proporção absurda de 397:2 (Salomão e Iannuzzi 2015). Aparentemente, as duas espécies apresentam-se como boas candidatas a bioindicadora de qualidade ambiental, mas provavelmente com padrões diferentes de sensibilidade. Nas regiões onde as espécies coocorreram, apresentaram também o mesmo padrão de coloração, conforme observação feita por Halffter & Martínez (1967), de modo que só podem ser identificados por caracteres diagnósticos específicos.

A hipótese filogenética (Figura 1.4) sugere uma clara separação entre *C. staigi* e *C. sulcatus*. Curiosamente, *C. sulcatus* é mais aparentado com *C. auricollis* (a espécie

mais diferenciada morfologicamente em *Peltecanthon*) do que com *C. staigi*. As análises morfométricas também mostram que a forma da asa de *C. sulcatus* é mais próxima à de *C. auricollis* que à de *C. staigi*. Considerando que *C. smaragdulus* (o grupo externo da hipótese filogenética – pertencente ao subgênero *Goniocanthon*) também é morfológica e ecologicamente muito similar a *C. staigi* e *C. sulcatus*, além de também coocorrer com essas espécies em algumas localidades, leva à dedução de que *C. auricollis* tenha se diferenciado das outras após o isolamento de uma pequena população, provavelmente o ancestral de *C. auricollis* e *C. sulcatus*, que permaneceu pequena e isolada. De fato, o número de exemplares amostrado para *C. auricollis* (42 indivíduos) é bem inferior ao das outras espécies (709 *C. staigi*, 161 *C. sulcatus*), sugerindo que a população continua pequena. Ainda, os espécimes coletados de *C. auricollis* foram encontrados em regiões onde as outras duas espécies não ocorrem, com altitude marcadamente maior (mais de 500 m). Com isso, a proximidade morfológica de *C. sulcatus*, *C. staigi* e *C. smaragdulus* pode ser melhor explicada pela manutenção de características ancestrais que por convergência em função do ambiente por eles ocupado ou ao fato de serem filogeneticamente muito próximos.

O clado que agrupa os espécimes identificados como *C. staigi* está claramente subdividido em três grupos monofiléticos. A separação dos espécimes de Pernambuco com os demais pode ser devida à distância geográfica entre eles. Por outro lado, os espécimes de São Paulo foram coletados no litoral norte (Caraguatatuba e Bertioga-SP), numa região muito próxima aos coletados no estado do Rio de Janeiro, que fazem parte de outra linhagem. Estas diferenças podem ser uma evidência de que *C. staigi* não seja uma única espécie, mas serão necessários novos estudos para testar esta hipótese.

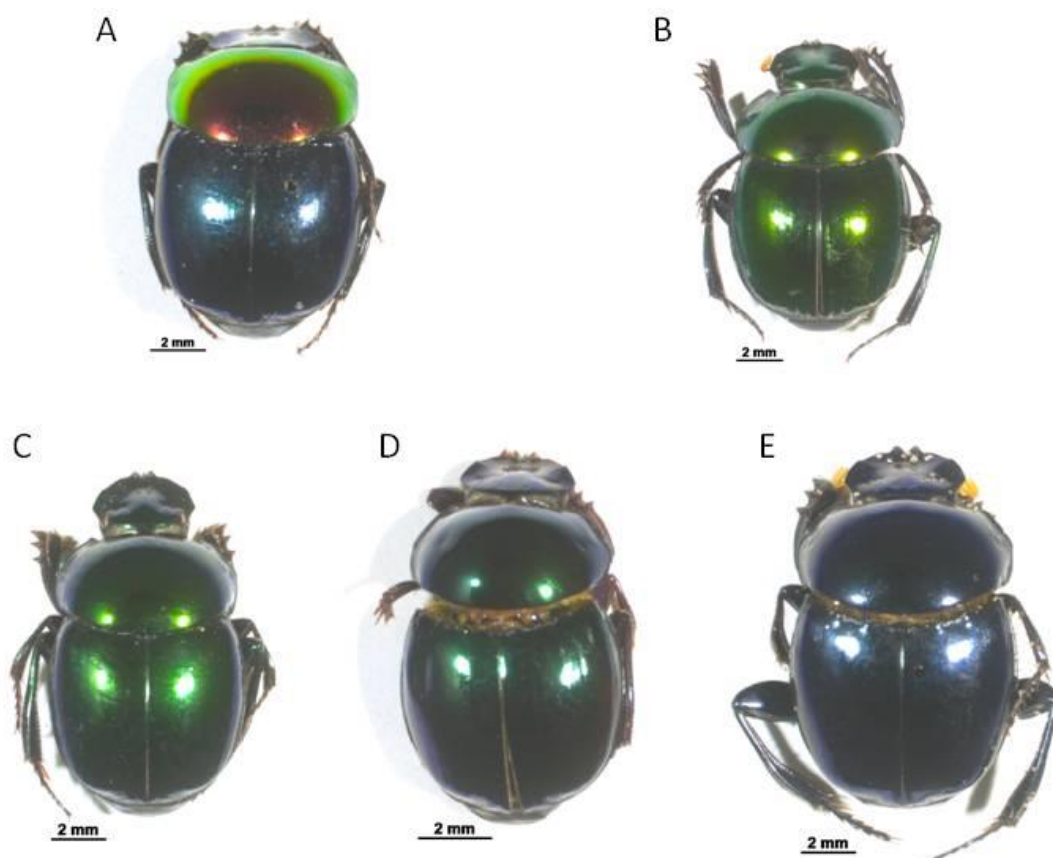
## **CAPÍTULO 2: Detecção de espécies crípticas em *Canthon staigi* (Scarabaeidae: Scarabaeinae): uma abordagem multidisciplinar**

### **2.1. Introdução**

*Canthon (Peltecanthon) staigi* Pereira, 1953 (Figura 2.1) é uma espécie de besouro rola-bosta presente na costa leste brasileira desde o nordeste até o sul, chegando à Argentina e ao Paraguai (Halfpter & Martínez 1967). É bastante comum em áreas de restinga preservada (Vieira *et al.* 2008), onde pode ser uma das espécies mais abundantes (Costa *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2014). *Canthon staigi* vem sendo tratada como bioindicadora da qualidade do hábitat (Hernández *et al.* 2014), sendo sensível à destruição promovida pela ação antrópica que leva a alterações na fisionomia da vegetação (Vieira *et al.* 2008).

No Brasil, *C. staigi* ocorre em áreas de baixa altitude (Louzada *et al.* 1996) nos estados litorâneos da Paraíba ao Paraná, incluindo também Minas Gerais e Amazonas (Pereira 1953; Halfpter & Martínez 1967, 1977). Halfpter & Martínez (1967) observaram padrões de coloração específicos aparentemente relacionados à altitude e ao bioma, sendo esverdeados os exemplares de regiões litorâneas e azuis os de maiores altitudes (localizadas em fragmentos florestais de montanhas em São Paulo, Paraná e Argentina). Estes autores sugeriram que *C. staigi* pode abrigar duas subespécies distintas e que a questão deve ser estudada mais a fundo.

O monofiletismo de *C. staigi* já foi verificado e uma análise molecular prévia mostrou uma aparente divisão da espécie em três clados (Capítulo 1). No presente estudo pretendemos verificar a identidade de *C. staigi* investigando se as três linhagens detectadas previamente são evolutivamente independentes e se outros tipos de marcadores reforçam esta divisão. Para isto, utilizamos uma abordagem mista, utilizando marcadores moleculares (um gene mitocondrial, COI, que também serviu para a busca de uma região de *Barcode*); marcadores morfométricos (baseados na forma da asa); e de coloração (baseado na análise dos padrões de coloração corporal).



**Figura 2.1:** Espécimes de *Peltecanthon*. **A:** *Canthon auricollis*, Vargem Alta-MG; **B:** *Canthon sulcatus*, Trapiche-PE; **C:** *Canthon staigi*, Linhares-ES; **D:** *C. staigi*, Aldeia-PE; **E:** *C. staigi*, Bertioga-SP.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Amostragem

A amostragem foi composta de exemplares de *C. staigi* coletados em campo, de exemplares provenientes da Coleção Zoológica da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) (SZMT-CEMT) e de doações por outros pesquisadores.

As coletas foram feitas na estação chuvosa com armadilhas do tipo *pitfall* iscadas com fezes humanas e contendo álcool combustível como solução mortífera (Szinwelski *et al.* 2012), expostas em campo durante 24-48 horas. Após a coleta, os

besouros foram acondicionados em tubos de congelamento com álcool etílico 96°GL e mantidos em freezer -20°C.

Os exemplares provenientes de Coleção Entomológica foram coletados com armadilhas do tipo *pitfall* iscadas com fezes humanas e contendo como solução mortífera uma combinação de água-sabão-sal, expostas em campo durante 48 horas. Após a coleta, os besouros foram armazenados em álcool etílico até serem destinados à triagem, sendo acondicionados em mantas de algodão para secagem em estufa e posterior montagem em alfinete entomológico. A maioria dos espécimes estudados encontra-se nas mantas de algodão.

Os exemplares obtidos por doações por outros pesquisadores foram coletados e acondicionados em álcool, mas não nos foram informados mais detalhes do procedimento de coletas.

A identificação até o nível específico foi feita com base na literatura (Pereira 1953; Halffter & Martínez 1967) e por comparação com exemplares da Coleção Zoológica da UFMT.

### **2.2.2. Análise molecular**

#### **2.2.2.1. Escolha dos genes**

Foi escolhido como marcador mitocondrial o gene que codifica a subunidade I da Citocromo Oxidase (COI), amplificado utilizando-se os *primers* universais Pat (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') e Jerry (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') (Simon *et al.* 1994), e como marcador nuclear, o segundo espaçador transcrito interno (ITS2) do rDNA, amplificado utilizando-se os *primers* ITS2-F (5'-GGGTCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS2-R (5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3') (Navajas *et al.* 1998). A escolha desses marcadores foi feita em função das sequências de *Canthon* e outros Scarabaeinae existentes no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 2.2.2.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Para obtenção de material genético de qualidade, foram utilizados somente exemplares coletados e acondicionados em álcool. De cada amostra, no máximo duas pernas (posteriores e/ou medianas) do mesmo lado do corpo foram retiradas para extração do DNA, que foi feita utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega).

A amplificação do DNA por PCR foi realizada em reações com volume final de 25µL consistindo de: MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); tampão (1x-Promega); dNTP (0,2mM cada); *primer* (0,2µM cada); Taq polimerase (1,25U-Promega) e DNA molde (2µL). As reações de PCR foram submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação inicial por 5' a 94°C; 10 ciclos de *touch down*, onde a temperatura de *annealing* diminuiu 1°C a cada ciclo, consistido de desnaturação de 1' a 94°C, 1'45" para *annealing* (55-45°C); 1'45" de extensão a 72°C; 30 ciclos de desnaturação com 1' a 94°C, 1'45" a 45°C para *annealing* e extensão de 1'45" a 72°C; e uma extensão final por 5' a 72°C.

O resultado da amplificação do DNA foi observado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed<sup>TM</sup> (Uniscience). Quando a amplificação do DNA resultou em bandas duplas (que foi o caso de algumas amostras do ITS2), foi feito o recorte e purificação dessas bandas para selecionar somente a banda de interesse para sequenciamento. A purificação foi feita utilizando-se o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

A purificação e o sequenciamento dos produtos amplificados foram realizados pelo método Sanger, utilizando o serviço de sequenciamento da empresa Macrogen, na Coreia (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Para cada amostra foi produzida uma sequência *forward* e uma *reverse* a fim de obter uma sequência consenso. Para confirmar se as sequências correspondem à região alvo e ao grupo taxonômico de interesse, foram realizadas buscas no banco de dado NCBI, por meio do programa BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

### 2.2.2.3. Análises filogenéticas

A qualidade dos eletroferogramas obtidos após a reação de sequenciamento foi avaliada com o auxílio do programa CodonCode Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation) e apenas as que apresentaram boa qualidade (ausência de picos duplos nos eletroferogramas) foram utilizadas nas análises subsequentes.

As sequências foram alinhadas pelo método ClustalW (Thompson *et al.* 1994), disponível no pacote MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) e refinadas por inspeção visual. Como o COI é codificador de aminoácidos, as sequências foram traduzidas para a sequência de aminoácidos correspondente e alinhadas, com subsequente reversão para as sequências de nucleotídeos. Esta etapa requer o posicionamento de todas as sequências no frame de leitura e todas as sequências com indícios de *numts* (*stop codons* prematuros, inserções ou deleções não múltiplas de 3 – Cristiano *et al.* 2012) foram retiradas da análise.

Para inferir a hipótese filogenética baseada unicamente no COI, utilizamos como *outgroups* nove exemplares de *C. sulcatus*, dois de *C. auricollis* e dois de *Canthon* (*Goniocanthon*) *smaragdulus* (Fabricius, 1781) (subgênero considerado próximo de *Peltecanthon* – Halfpeter & Martínez 1967), cujas sequências foram obtidas com o mesmo protocolo utilizado para os *C. staigi*. Utilizamos ainda um exemplar de *Temnoplectron* sp. (Deltachilini), cuja sequência foi obtida no banco de dados *Genbank* (Número de Acesso KF801975.1).

Para a hipótese baseada no ITS2, utilizamos como *outgroups* um exemplar de *C. sulcatus*, quatro de *C. auricollis* e um de *C. smaragdulus*, cujas sequências foram obtidas com o mesmo protocolo utilizado para os *C. staigi*. Utilizamos ainda um exemplar de *Circellium bacchus* (Fabricius, 1781) (Deltachilini), cuja sequência foi obtida no banco de dados *Genbank* (Número de Acesso JN657160.1).

#### 2.2.2.4. Seleção de modelos

A escolha de modelos de substituição para cada árvore (as duas árvores baseadas nos genes separados e a árvore concatenada) foi feita de forma independente. Utilizamos o programa PartitionFinder2 (Lanfear *et al.* 2016) para definir o melhor modelo de substituição para cada posição do códon.

#### 2.2.2.5. Inferência Filogenética

Uma vez obtidos os modelos a serem utilizados em cada inferência filogenética, utilizamos o programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) para otimizar a topologia, os tamanhos de ramos e os valores dos parâmetros de cada modelo envolvido em cada análise pela da Inferência Bayesiana (Yang & Ranalla 1997). Em cada uma das três análises, o MrBayes percorreu o espaço de possibilidades ao longo de 50 milhões de passos, dos quais 25% foram eliminados para a obtenção de uma árvore consenso.

#### 2.2.3. DNA Barcoding

Dentro do alinhamento das sequências de COI de *Peltecanthon*, buscamos uma região de no máximo 600 bp que fosse pouco variável dentro de uma mesma linhagem e muito variável entre diferentes linhagens. Uma vez detectada esta região, construímos um dendrograma baseado na distância de Kimura-2-Parâmetros (Kimura 1980) utilizando o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987).

As sequências alinhadas e recortadas para DNA *barcoding* foram avaliadas no programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD – Puillandre *et al.* 2011 - <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), um primeiro passo para hipotetizar a existência de diferentes espécies em um grupo, baseada no *gap*, também chamado de *gap de barcode*, existente entre a diversidade intra e a interespecífica. Smith *et al.* (2005) propuseram que a divergência intraespecífica não deve passar de 3%, enquanto

Hebert *et al.* (2004) propuseram a regra das 10X (a divergência entre espécies deve ser no mínimo 10 vezes maior que dentro das espécies).

Utilizamos como critérios as configurações de variação intraespecífica mínima (Pmin) de 1%, máxima (Pmax) de 3%, com 10 passos, com largura inicial do *gap* interespecífico relativo de 1,5X, número de *bins* (Nb bins) de 20, utilizando a distância de Kimura (K80), com taxa de transição/transversão (R) variando conforme o grupo testado (para *C. staigi* R=10; para amostragem total R=17 – calculadas no programa MEGA 6.0, Tamura *et al.* 2013). Fizemos a análise reiteradas vezes partindo do *gap* de 1,5X e aumentando este valor até que apenas um grupo pudesse ser encontrado na amostra.

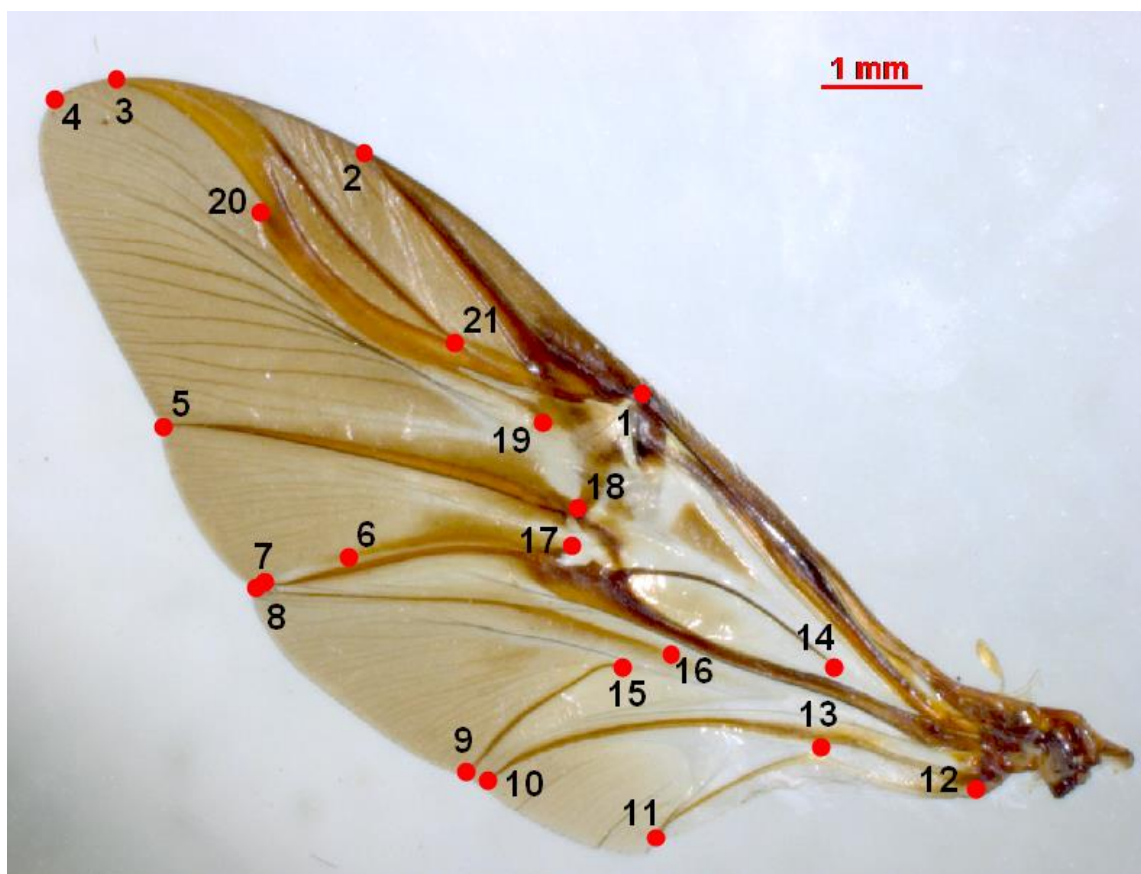
#### **2.2.4. Morfometria geométrica**

##### **2.2.4.1. Seleção e preparo do material**

Para as análises de morfometria geométrica da asa foram utilizados exemplares provenientes de coletas em campo e de coleção entomológica acondicionados em manta de algodão. Os indivíduos foram dissecados para retirada da genitália e identificação do sexo, já que a espécie não apresenta dimorfismo sexual na morfologia corporal. As asas membranosas esquerdas foram excisadas em sua base, imersas em solução de água e detergente a 60°C para torná-las mais flexíveis e possibilitar sua montagem entre lâminas de vidro para microscopia, que garantem que todas as asas sejam fotografadas em um mesmo plano, permitindo a comparação entre elas. O restante do corpo de cada espécime voltou para seu acondicionamento original (álcool comercial -20°C ou manta de algodão), sendo identificado com um código para posterior acesso à informação individualizada.

Uma vez montadas entre as lâminas, as asas foram fotografadas em estereomicroscópio ZEISS SteREO Discovery V.20 acoplado de câmera digital ZEISS AxioCam MRc e as imagens foram obtidas pelo programa ZEISS Axio Vision Release 4.8.2 (<https://www.zeiss.com/corporate/int/home.html>), anotando-se a escala. As fotos

digitalizadas foram convertidas para a extensão .tps no programa TpsUtil v. 1.7 (Rohlf 2016). As imagens foram importadas para o programa TpsDig versão 2.26 (Rohlf 2016) para marcação dos marcos anatômicos (total de 21 – Figura 2.2) e padronização da escala. Os marcos anatômicos são pontos que devem ser reconhecíveis em todas as asas em estudo. As análises morfométricas partem do pressuposto de que estes pontos são homólogos e, portanto, comparáveis entre todos os indivíduos.



**Figura 2.2:** Asa posterior esquerda de *Canthon staigi* com 21 marcos anatômicos.

#### 2.2.4.2. Análises morfométricas

As amostras foram categorizadas por sexo e por linhagem filogenética (conforme resultado geral obtido nas análises moleculares). Para cada imagem foram feitas duas cópias e, em cada uma delas, os marcos anatômicos foram tomados independentemente. Esse procedimento permitiu quantificar o erro de marcação dos marcos anatômicos pela análise de variância ANOVA comparando-se a diferença entre as réplicas, que foi feita no programa MorphoJ 1.06d (Klingenberg 2011).

Em seguida, utilizando o programa MorphoJ, foi feita a inspeção e eliminação dos *outliers* e gerada a matriz de variância-covariância dos resíduos. Para atender aos pressupostos de alguns testes utilizados com relação à normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Normalidade Multivariada no programa PAST 3.14 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

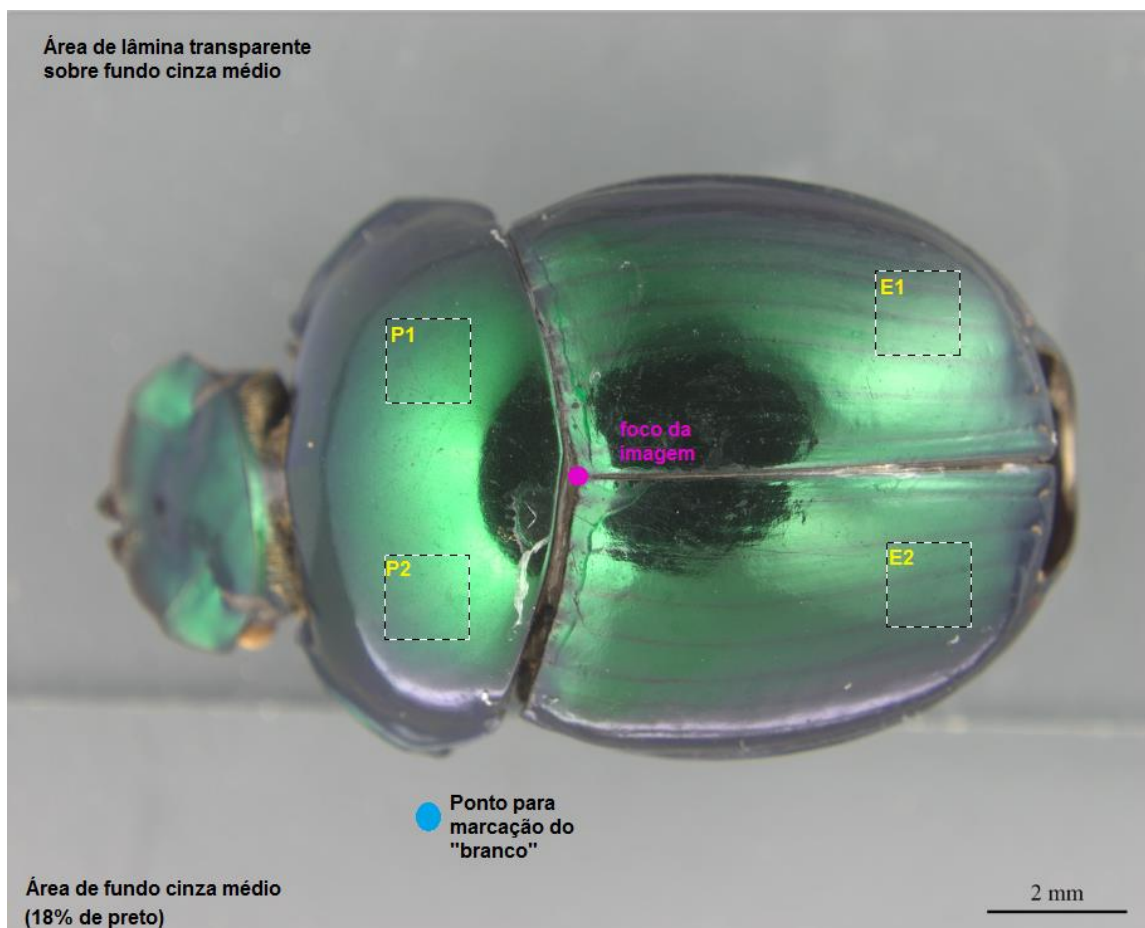
Investigamos se há dimorfismo sexual na forma da asa pela Análise de Função Discriminante com 10.000 permutações considerando as distâncias de Procrustes e Mahalanobis (significância 0,05), calculadas no MorphoJ.

A variabilidade na forma da asa das diferentes espécies foi acessada pela Análise dos Componentes Principais, com gráficos apresentando elipses com 90% de confiança da média agrupando cada linhagem. Para verificar se há diferenças na forma das asas entre as linhagens de *C. staigi*, foi utilizada a Análise de Variáveis Canônicas com 10.000 permutações, baseadas nas linhagens obtidas nas análises moleculares. Utilizando a Análise de Função Discriminante, calculamos a distância par-a-par de Mahalanobis (significância 0,05), com 10.000 permutações, a fim de determinar a significância estatística das diferenças de formato médio entre as diferentes linhagens. O papel do Tamanho do Centróide na variação entre as linhagens foi analisado por ANOVA (*one-way*) e por comparação par-a-par pelo teste de Tukey (HSD) no PAST.

### 2.2.5. *Análise dos padrões de coloração corporal*

Foram utilizados para a análise da coloração corporal somente espécimes coletados e acondicionados exclusivamente em álcool (etílico ou combustível) a fim de evitar alterações nos padrões de coloração estrutural que podem ser provocados na coleta com água e sabão. Os exemplares foram retirados do álcool para secar à temperatura ambiente por pelo menos 24 horas. Foram então preparados para obtenção das imagens: posicionados dorsalmente sobre lâmina de vidro para microscopia, sendo esta posicionada sobre um “fundo branco” que consiste em um cartão padrão cinza médio de 18% de preto (Figura 2.3). Os besouros foram posicionados de maneira padronizada (em relação ao aumento da objetiva, à lâmina, ao fundo branco e ao foco da imagem posicionado sobre o escutelo – Figura 2.3). Para ajustar a iluminação foi utilizado um difusor de papel vegetal entre o objeto e as lâmpadas. As fotografias foram tomadas em estereomicroscópio ZEISS Discovery V20 com objetiva planapocromática de 1,0 acoplado de câmera ZEISS AxioCam 506 e as imagens foram obtidas pelo programa ZEISS Zen 2012 (<https://www.zeiss.com/corporate/int/home.html>), anotando-se a escala. A velocidade do obturador (ou tempo de exposição) foi padronizada em 800.000 s. As imagens foram salvas no formato .tif e analisadas no programa Adobe Photoshop\* CS5 Extended versão 12.0x64 (<http://www.adobe.com/br/products/photoshop.html>).

Na imagem de cada exemplar foram amostrados o pronoto e o élitro, com duas repetições independentes à direita e à esquerda da linha corporal mediana, conforme ilustrado na Figura 2.3. Os quadrados foram amostrados em tamanho padronizado de 200x200 pixels (área total de cada quadrado correspondendo a 40.000 pixels). Utilizamos o modelo RGB (*red-green-blue*) para obtenção dos valores médios dos componentes de coloração dentro de cada área medida. Cada componente de coloração foi analisado independentemente conforme as categorias Vermelho, Verde e Azul, para o pronoto e para o élitro. Para cada componente, em cada área corporal (pronoto e élitro) e em cada indivíduo, foi calculada a média dos valores entre as duas repetições.



**Figura 2.3:** Exemplar de *Canthon staigi* com modelo esquemático para obtenção de duas amostragens em quadrados de área de 200x200 pixels no pronoto (P1 e P2) e no élitro (E1 e E2) para análise dos padrões de coloração pelo sistema RGB.

A contribuição das diferentes componentes de coloração foi comparada dentro e entre as linhagens obtidas com a análise molecular, separadamente para o pronoto e para o élitro, pelo teste de Kruskal-Wallis (devido às variâncias desiguais das amostras) seguido de Mann-Whitney para comparação par-a-par (significância de 0,05) no programa PAST 3.14 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Amostragem**

Para a realização deste trabalho foram utilizados exemplares provenientes de coleta em campo, de coleção entomológica e de doações por outros pesquisadores (Tabela 2.1). Expedições em campo foram realizadas nas seguintes localidades: Parque Nacional do Pau Brasil, no município de Porto Seguro-BA; Reserva Natural da Vale, no município de Sooretama-ES; Parque Estadual do Rio Doce, no município de Marliéria-MG; Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, no município de São Francisco de Itabapoana-RJ; área particular no município de Caraguatatuba-SP. Todos os exemplares foram coletados e acondicionados em álcool 92°GL.

Exemplares provenientes de Aldeia-PE, Pesqueira-PE e de Bertioxa-SP (Reserva Particular do Patrimônio Natural SESC Bertioxa) foram provenientes de doações por outros pesquisadores, tendo sido devidamente coletados e acondicionados em álcool 92°GL.

Os exemplares das localidades de Araçoiaba-PE e Porto Seguro-BA foram provenientes da Coleção Entomológica da UFMT e encontravam-se acondicionados já secos, montados em manta de algodão.

**Tabela 2.1:** Amostragem de *Canthon staigi*: Localidades amostradas. Procedência do material: CO – coleção, CT – coleta ou DO – doação; doadores de exemplares: \*1 Profa. Rita de Cássia Moura, Universidade do Pernambuco; \*2 Rafael Vieira Nunes, Universidade Federal do Mato Grosso. Solução mortífera utilizada na coleta: ADS – água-detergente-sal ou ALC – álcool. Acondicionamento após triagem e identificação: VS – exemplares acondicionados em via-seca (manta ou alfinete entomológico) ou VU – exemplares acondicionados em via-úmida (álcool). Linhagem filogenética: L1-Pernambuco, L2-Sudeste, L3-São Paulo. Amostragem utilizada para análises morfométricas (machos e fêmeas). Amostragem utilizada para a análise dos padrões de coloração corporal.

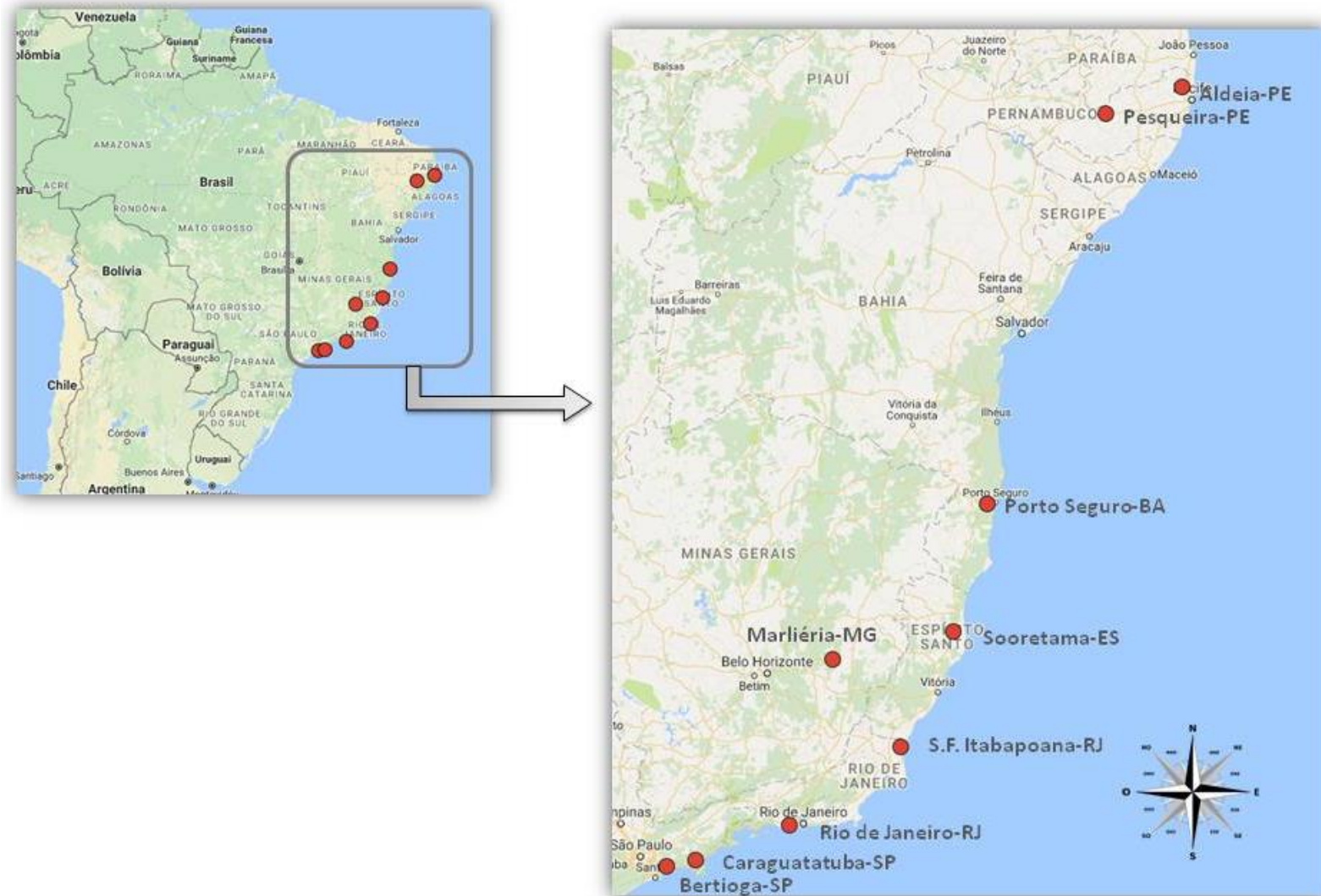
| Localidade                                                                | Procedência /<br>solução mortífera /<br>acondicionamento | Análises<br>filogenéticas<br>(COI / ITS2) | Linhagem<br>filogenética | Análises<br>morfométricas<br>(macho/fêmea) | Análise da<br>coloração<br>corporal |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| Aldeia-PE                                                                 | DO*1/ALC/VU                                              | 10 / 4                                    | L1-Pernambuco            | -                                          | 5                                   |
| Pesqueira-PE                                                              | DO*1/ALC/VU                                              | 5 / 6                                     | L1-Pernambuco            | -                                          | 5                                   |
| Araçoiaba-PE                                                              | CO/ADS/VS                                                | -                                         | L1-Pernambuco            | 11 / 0                                     | -                                   |
| Porto Seguro-BA (PARNA do Pau Brasil)                                     | CT/ALC/VU                                                | 5 / 1                                     | L2-Sudeste               | -                                          | -                                   |
| Porto Seguro BA                                                           | CO/ADS/VS                                                | -                                         | L2-Sudeste               | 8 / 9                                      | -                                   |
| Sooretama-ES (Reserva Natural da Vale)                                    | CT/ALC/VU                                                | 9 / 4                                     | L2-Sudeste               | 6 / 9                                      | 4                                   |
| Marliéria-MG (Parque Estadual do Rio Doce)                                | CT/ALC/VU                                                | 10 / 5                                    | L2-Sudeste               | 8 / 7                                      | 4                                   |
| São Francisco do Itabapoana-RJ (Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba) | CT/ALC/VU                                                | 10 / 5                                    | L2-Sudeste               | 4 / 11                                     | 3                                   |
| Rio de Janeiro-RJ (Parque Estadual da Pedra Branca)                       | CT/ALC/VU                                                | 7 / 2                                     | L2-Sudeste               | -                                          | 3                                   |
| Caraguatatuba-SP                                                          | CT/ALC/VU                                                | 2 / 1                                     | L3-São Paulo             | 2 / 0                                      | 2                                   |
| Bertioga-SP (RPPN SESC Bertioga)                                          | DO*2/ALC/VU                                              | 4 / 4                                     | L3-São Paulo             | 5 / 4                                      | 4                                   |

### 2.3.2. Análises filogenéticas

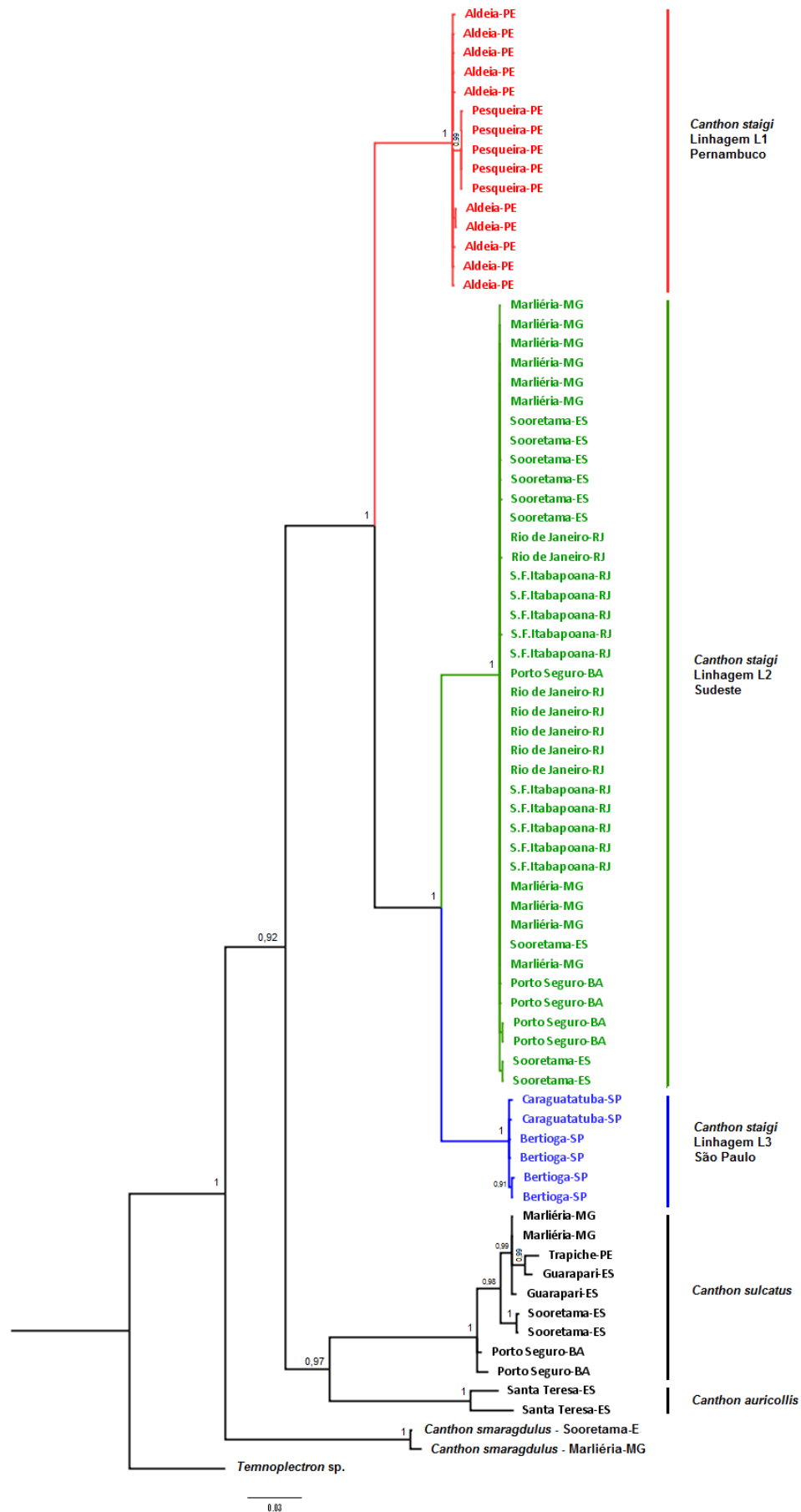
#### 2.3.2.1. O marcador mitocondrial COI

O esforço de sequenciamento e inspeção das sequências de boa qualidade resultou em uma amostragem de 62 sequências parciais de COI para *C. staigi* (provenientes das localidades ilustradas na Figura 2.4), e para os *outgroups*, nove sequências de *C. sulcatus*, duas de *C. auricollis*, duas de *C. smaragdulus* além da inclusão de um exemplar *Temnoplectron* sp. A hipótese filogenética compreendeu um alinhamento total de 978 sítios, sendo 120 deles variáveis (Figura 2.5).

Essa hipótese filogenética mostrou uma separação entre três linhagens evolutivas independentes dentro da espécie *C. staigi* em um nó ancestral com uma sustentação com probabilidade posterior PP= 1. A primeira divergência se observa na separação da linhagem representada pelos exemplares de Pernambuco, que chamamos de linhagem L1-Pernambuco. Em seguida, observamos a separação dos exemplares em duas linhagens bem definidas (probabilidade posterior igual a 1): linhagem L2-Sudeste, que compreende os exemplares das localidades dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e do sul da Bahia, e a linhagem L3-São Paulo, que compreende as localidades amostradas no estado de São Paulo.



**Figura 2.4:** Localidades de ocorrência de *Canthon staigi* amostradas nas análises filogenéticas com COI e ITS2.



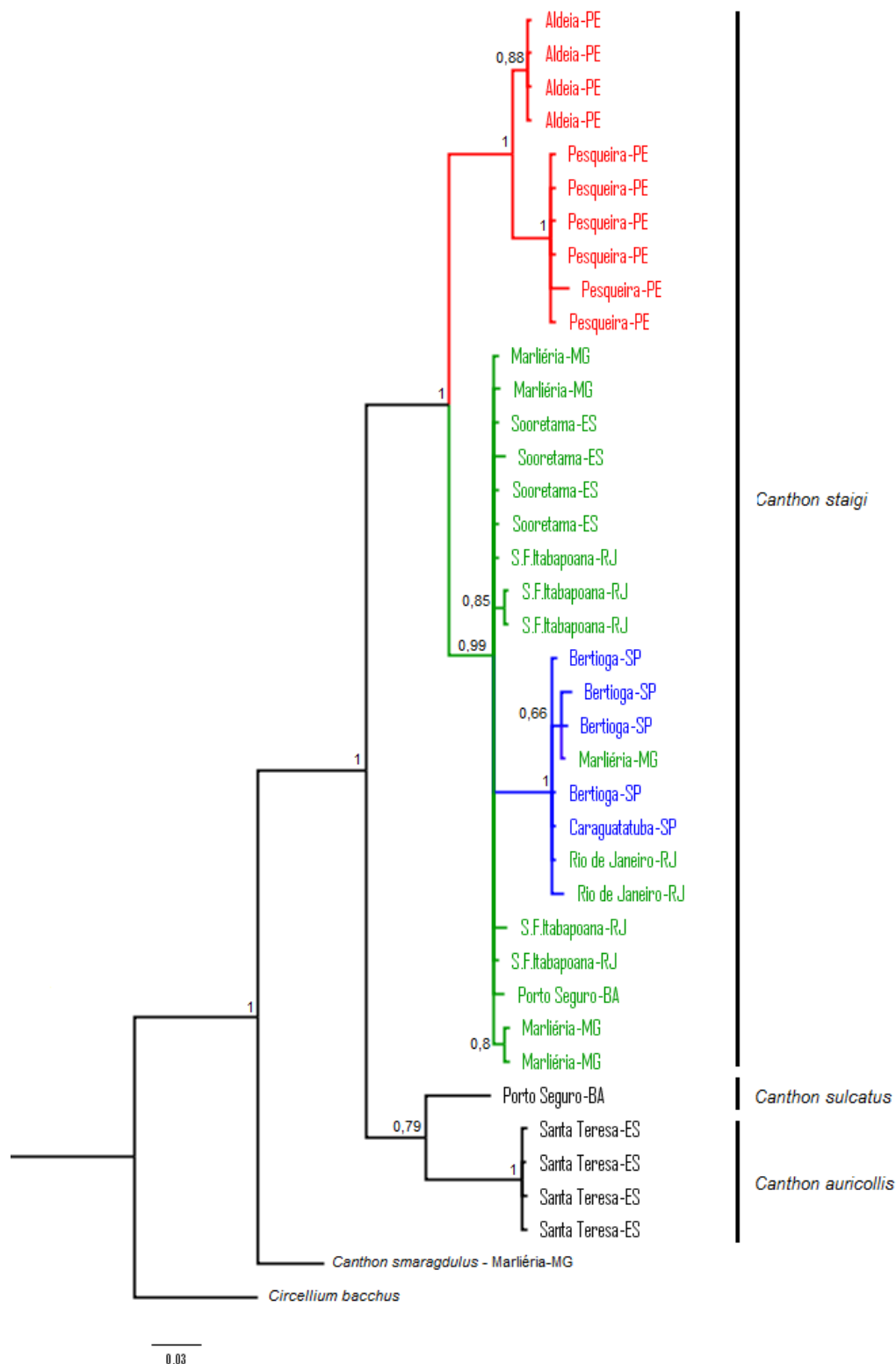
(Legenda na próxima página)

**Figura 2.5:** Hipótese filogenética do gene COI obtida por Inferência Bayesiana (50 milhões de gerações com *burnin* de 25%) para exemplares de *Canthon staigi*. Os valores ao lado dos nós ancestrais correspondem à probabilidade posterior (PP). Sequências de *Canthon sulcatus*, *Canthon auricollis*, *Canthon smaragdulus* e *Temnoplectron* sp. (Genbank Número de Acesso KF801975.1) foram utilizadas como *outgroups*. Em vermelho está representado o clado contendo os exemplares da espécie *Canthon staigi* que compõem a linhagem L1-Pernambuco, em verde a linhagem L2-Sudeste e em azul a linhagem L3-São Paulo. Os nós terminais foram identificados segundo o local de coleta de cada espécime.

#### 2.3.2.2. O marcador nuclear ITS2

O esforço de sequenciamento e inspeção das sequências de boa qualidade resultou em uma amostragem de 32 sequências parciais de ITS2 de diferentes tamanhos para *C. staigi* (provenientes das localidades ilustradas na Figura 2.4), e para os *outgroups*, uma para *C. sulcatus*, quatro para *C. auricollis*, uma para *C. smaragdulus* além da inclusão de uma sequência de *C. bacchus*. A hipótese filogenética compreendeu um alinhamento total de 492 sítios, sendo 220 deles variáveis (Figura 2.6).

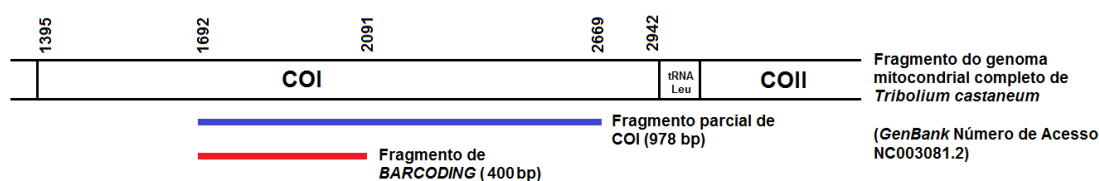
Essa hipótese mostrou a separação de duas linhagens evolutivas (PP=1): uma representada pelas localidades do estado do Pernambuco, correspondente à linhagem L1-Pernambuco do COI, e outra compreendendo as localidades que vão do sul da Bahia até São Paulo, correspondente às linhagens L2+L3 de COI.



**Figura 2.6:** Hipótese filogenética da região ITS2 obtida por Inferência Bayesiana (50 milhões de gerações com *burnin* de 25%) para exemplares de *Canthon staigi*. Os valores ao lado dos nós ancestrais correspondem à probabilidade posterior (PP). Sequências de *Canthon sulcatus*, *Canthon auricollis*, *Canthon smaragdulus* e *Circellium bacchus* (Genbank Número de Acesso JN657160.1) foram utilizadas como *outgroups*. Em vermelho estão indicados os exemplares de Pernambuco (correspondentes à linhagem L1-Pernambuco do COI), em verde, os exemplares da região Sudeste (correspondentes à linhagem L2-Sudeste do COI) e em azul os exemplares de São Paulo (correspondentes à linhagem L3-São Paulo do COI). Os nós terminais foram identificados segundo o local de coleta de cada espécime.

### 2.3.3. DNA Barcoding

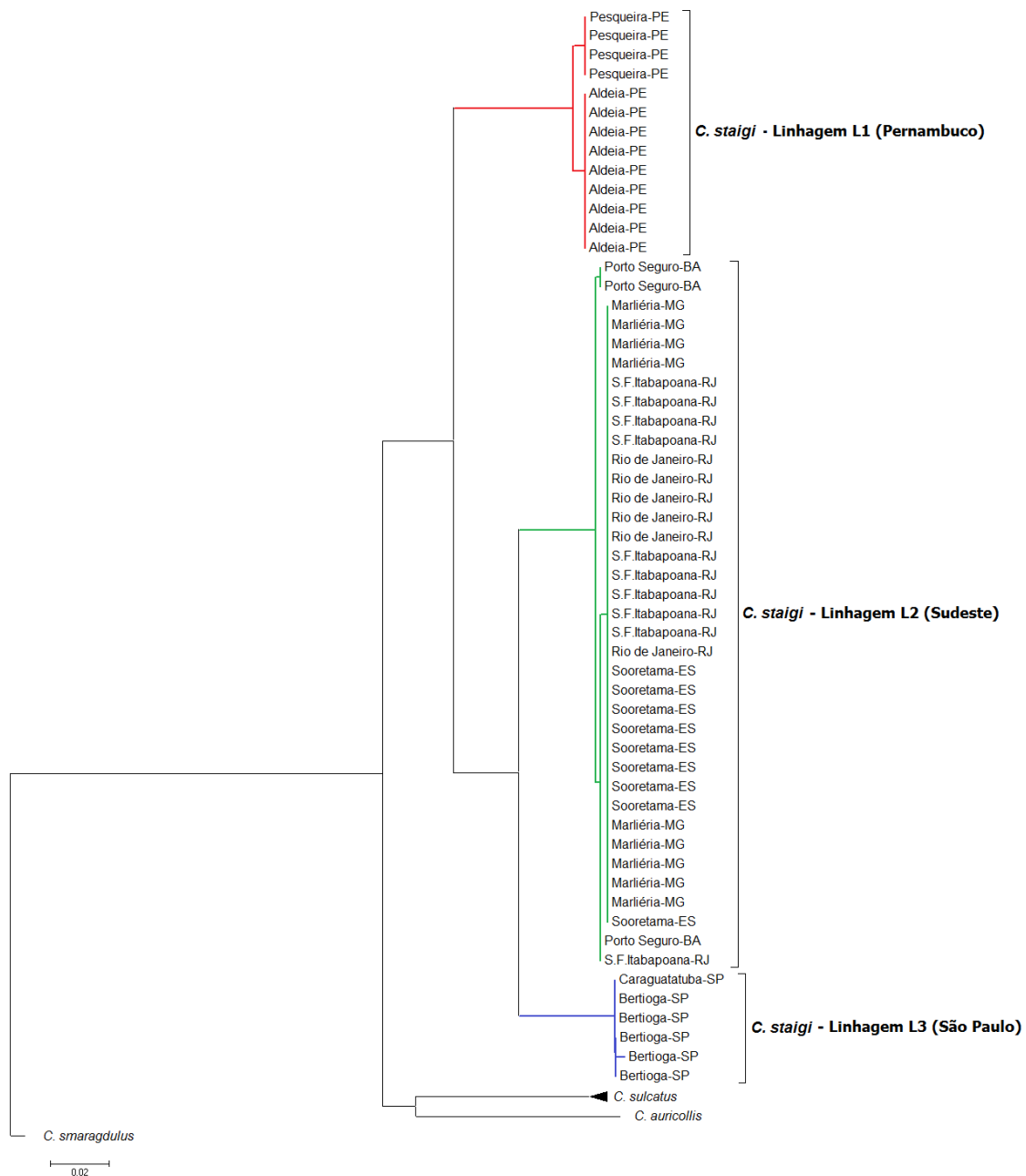
A análise visual do alinhamento mostrou que a porção inicial da sequência parcial do COI apresentava mais variação interespecífica que intraespecífica. Com isso, delimitamos uma região de 400 nucleotídeos (Figura 2.7) localizada entre os sítios 1692 e 2091 do genoma mitocondrial completo de *Tribolium castaneum* utilizado como referência.



**Figura 2.7:** Representação esquemática da posição relativa dos fragmentos de COI parciais de 978 bp e 400 bp sobre o genoma mitocondrial completo de *Tribolium castaneum* (GenBank Número de Acesso NC003081.2).

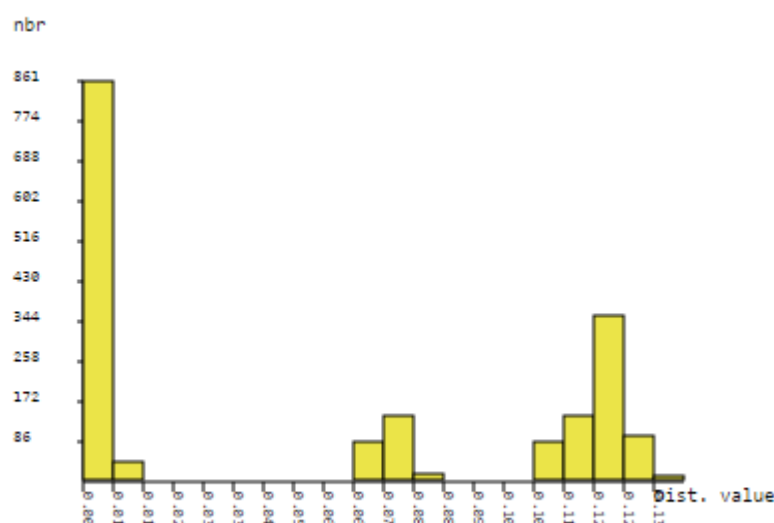
O dendrograma obtido com o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) utilizando a distância de Kimura-2-Parâmetros (Kimura 1980) (Figura 2.8) mostrou uma clara separação entre as espécies de *Peltecanthon*. Além disso, evidenciou o mesmo padrão exibido pelo alinhamento de COI contendo 978 bp (Figura 2.5), com três linhagens de *C. staigi*, sendo L2-Sudeste e L3-São Paulo foram mais próximas entre si e irmãs de L1-Pernambuco.

A investigação da variação interespecífica no ABGD mostrou que o *gap* que sustenta a existência de três linhagens tem valor 15X, ou seja, a variação entre linhagens é 15 vezes maior que a variação intralinhagens (Figura 2.9).



**Figura 2.8:** Dendrograma obtido com o método de Neighbor-Joining utilizando a distância de Kimura-2-Parâmetros para *Canthon staigi*, *C. sulcatus*, *C. auricollis* e *C. smaragdulus* como outgroup.

Sequências correspondentes a cada uma das linhagens de *C. staigi*, bem como das espécies *C. auricollis*, *C. sulcatus* e *C. smaragdulus* serão depositadas no bando de dados mundial *Barcode of Life Data Systems* (BOLD SYSTEMS - <http://www.boldsystems.org>) (Ratnasingham & Hebert 2007).



**Figura 2.9:** Histograma mostrando o *gap* de *barcode* entre as divergências intra e interespecíficas. O primeiro conjunto de barras corresponde às distâncias intraespecíficas, que neste caso não passaram de 1,0%. O segundo conjunto agrupa as distâncias entre as linhagens de L2-Sudeste e L3-São Paulo. O terceiro conjunto agrupa as distâncias entre a linhagem L1-Pernambuco e as sequências das demais linhagens.

### 2.3.4. Análises morfométricas

A amostragem utilizada para análise morfométrica está apresentada na Tabela 2.1. Não foram observados *outliers* na amostra. O erro de digitação na tomada dos marcos anatômicos não foi significativo (Tabela 3.4 e Tabela 3.5 do Anexo) e os 21 marcos anatômicos foram aprovados na análise Normalidade Multivariada (Tabela 3.6 do Anexo).

A análise do dimorfismo sexual em *C. staigi* pela Função Discriminante mostrou divergência entre os resultados comparando as distâncias de Mahalanobis e de Procrustes (Tabela 2.2). Na distância de Mahalanobis não observamos variação na forma das asas entre machos e fêmeas ( $p=0,0867$ ), mas a distância de Procrustes mostrou variação ( $p=0,0419$ ). Assim, para as próximas análises de Função Discriminante, levamos em consideração somente os resultados apresentados pela Distância de Mahalanobis.

**Tabela 2.2:** Análise de Função Discriminante baseada nas distâncias de Mahalanobis e de Procrustes para comparação da forma das asas de machos e fêmeas na espécie *C. staigi*; *p*-valor significância de 0,05.

|                       | Distância de Mahalanobis | <i>p</i> -valor | Distância de Procrustes | <i>p</i> -valor |
|-----------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Canthon staigi</i> | 2,2441                   | 0,0867          | 0,0088                  | 0,0419          |

Considerando a divisão das populações de *C. staigi* em três linhagens baseada nos resultados das análises moleculares (hipótese filogenética baseada no COI, Figura 2.5, e resultado da análise de *C. staigi* obtido no ABGD), prosseguimos a análise da variação na forma das asas membranosas confrontando estas linhagens (L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo).

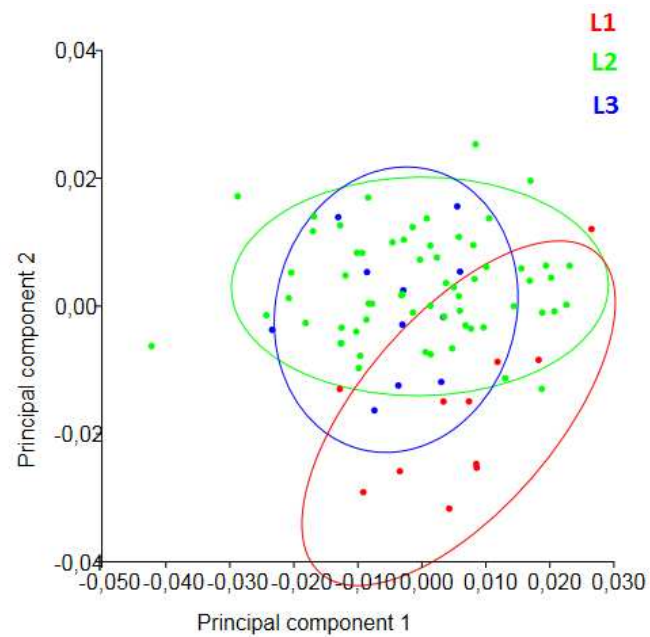
A análise de Componentes Principais indicou uma sobreposição das linhagens no espaço multivariado (Figura 2.10). Os dois primeiros eixos principais respondem por apenas 32,62% da variação na forma das asas (PC1=18,93% e PC2=13,69%).

A análise das Variáveis Canônicas indicou uma clara separação entre as três linhagens de *C. staigi* (Figura 2.11). O primeiro eixo canônico (CV1) explicou 65,15% da variação na forma e separou claramente a Linhagem L3-São Paulo das outras linhagens. O segundo eixo canônico (CV2) explicou os outros 34,85% da variação e separou a Linhagem L1-Pernambuco das outras linhagens.

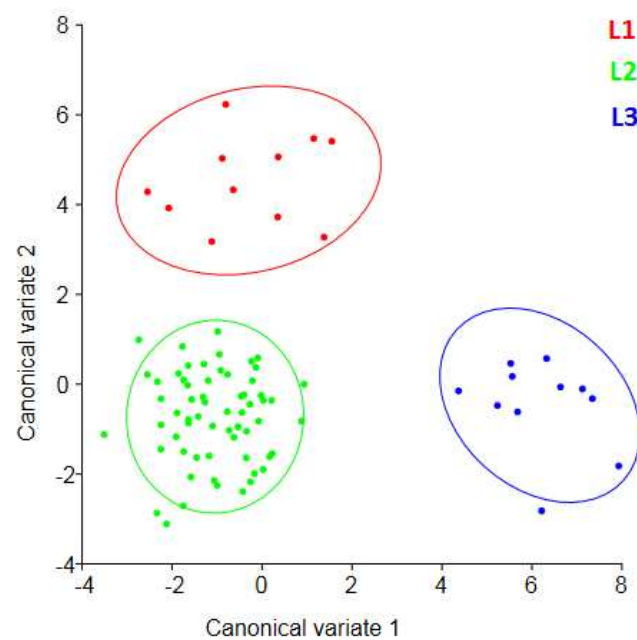
A análise de Função Discriminante mostrou a separação entre as linhagens com valores significativos para a distância de Mahalanobis (Tabela 2.3), sendo L1-Pernambuco e L2-Sudeste as mais semelhantes entre si.

**Tabela 2.3:** Discriminação da forma da asa de *Canthon staigi* pela Análise de Função Discriminante par-a-par comparando três linhagens filogenéticas. Diagonal inferior: distância de Mahalanobis; Diagonal superior: *p*-valor, significância 0,05.

|                        | Distância de Mahalanobis  |                        |                          |
|------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
|                        | Linhagem L1<br>Pernambuco | Linhagem L2<br>Sudeste | Linhagem L3<br>São Paulo |
| Linhagem L1-Pernambuco | -                         | 0,0003                 | <0,0001                  |
| Linhagem L2-Sudeste    | 5,4703                    | -                      | <0,0001                  |
| Linhagem L3-São Paulo  | 6,7072                    | 8,4746                 | -                        |

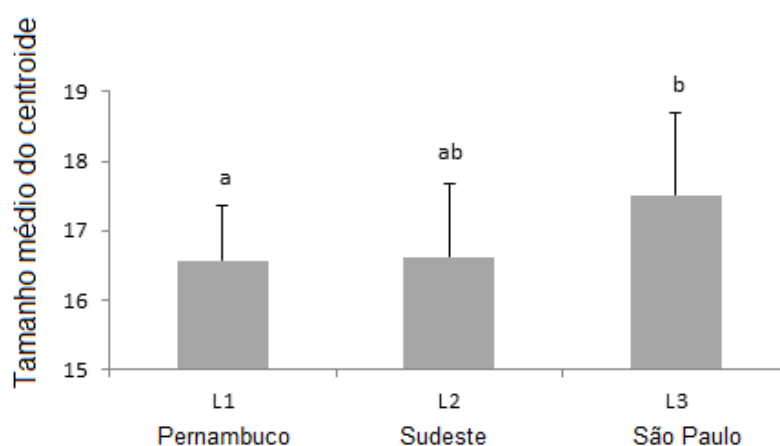


**Figura 2.10:** Análise de Componentes Principais da morfometria da asa posterior de *Canthon staigi*: PC1 x PC2 apresentando três linhagens (L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo) em elipses com 90% de intervalo de confiança.



**Figura 2.11:** Análise de Variáveis Canônicas da morfometria da asa posterior de *Canthon staigi*: CV1 x CV2 apresentando três linhagens definidas *a priori* (L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo) em elipses com 90% de intervalo de confiança.

O papel do Tamanho do Centroide na discriminação das linhagens, testada pela análise de variância ANOVA *one-way* seguida da comparação par-a-par de Tukey, mostrou haver diferença no tamanho das asas entre as três linhagens separando a Linhagem L1-Pernambuco da Linhagem L3-São Paulo ( $F=3,511$ ;  $p=0,0345$ ; Figura 2.12). Os exemplares da linhagem L3-São Paulo foram significativamente maiores que os de L1-Pernambuco. A Linhagem L2-Sudeste surge como uma linhagem de tamanho intermediário entre os dois extremos representados por L1-Pernambuco e L3-São Paulo.



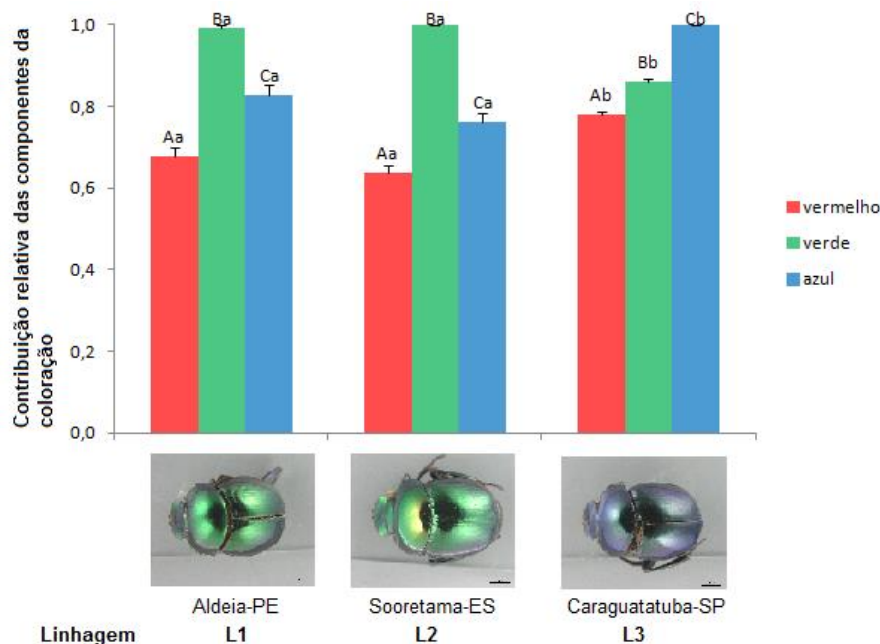
**Figura 2.12:** Tamanho do Centroide (média e desvio padrão) das asas de besouros da espécie *Canthon staigi* de três diferentes linhagens (L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo). Letras diferentes acima das barras de erro correspondem a valores médios de tamanho de centroide significativamente diferentes entre si (significância 0,05).

### 2.3.5. Análise dos padrões de coloração corporal

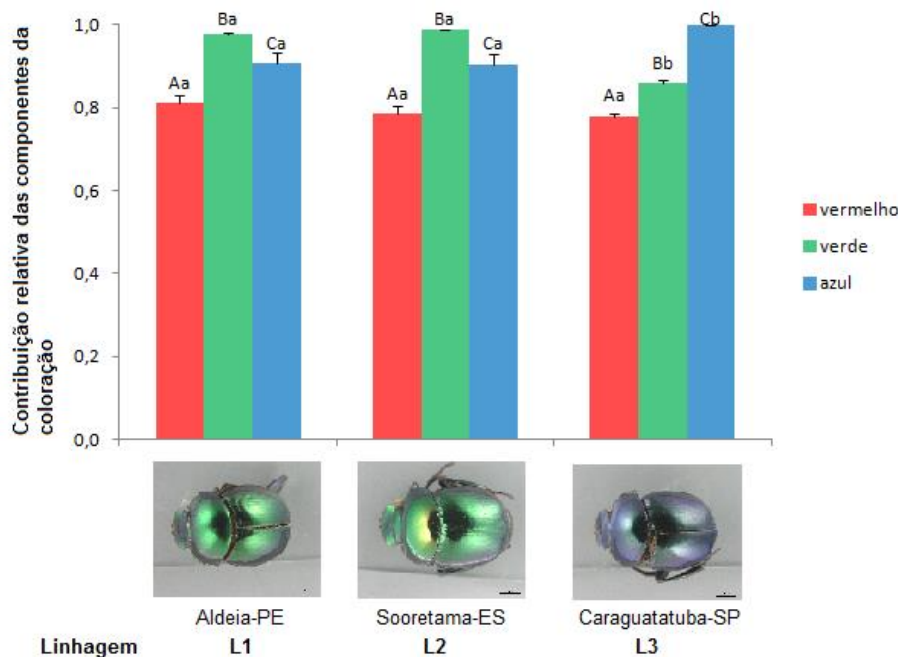
Considerando a divisão das populações de *C. staigi* em três linhagens baseada nos resultados das análises moleculares (hipótese filogenética baseada no COI, Figura 2.5, e resultado da análise de *C. staigi* obtido no ABGD), prosseguimos a análise dos padrões de coloração corporal dentro da denominação *C. staigi* confrontando estas linhagens (L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo). O desenho amostral para esta análise está descrito na Tabela 2.1.

A análise da coloração da parte dorsal do corpo dos besouros pela decomposição das cores na escala RGB mostrou que é possível diferenciar a Linhagem L3-São Paulo, das outras duas linhagens (L1-Pernambuco e L2-Sudeste) analisando-se tanto o élitro

quanto o pronoto (Figura 2.13 e Figura 2.14). Observamos uma tendência à compensação entre as componentes Verde e Azul: quando uma aumenta, a outra diminui e vice-versa. A componente mais significativa na formação das cores nas linhagens L1-Pernambuco e L2-Sudeste é a verde, enquanto na L3-São Paulo a componente mais significativa é a azul, tanto no pronoto como no élitro. A componente vermelha só foi significativamente diferente entre as linhagens para o pronoto, sendo mais intensa nos indivíduos da linhagem L3-São Paulo.



**Figura 2.13:** Contribuição relativa (média e desvio padrão) dos três componentes de coloração (Vermelho, Verde e Azul) na composição de cores do pronoto de exemplares de besouros da espécie *Canthon staigi* de três linhagens L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo. Letras maiúsculas correspondem à comparação entre as três diferentes cores dentro de cada linhagem; letras minúsculas correspondem à comparação de uma mesma cor entre as três diferentes linhagens – nível de significância 0,05.



**Figura 2.14:** Contribuição relativa (média e desvio padrão) dos três componentes de coloração (Vermelho, Verde e Azul) na composição de cores do élitro de exemplares de besouros da espécie *Canthon staigi* de três linhagens L1-Pernambuco, L2-Sudeste e L3-São Paulo. Letras maiúsculas correspondem à comparação entre as três diferentes cores dentro de cada linhagem; letras minúsculas correspondem à comparação de uma mesma cor entre as três diferentes linhagens – nível de significância 0,05.

## 2.4. Discussão

O monofiletismo de *C. staigi* já foi verificado e uma análise molecular prévia mostrou uma aparente divisão da espécie em três clados (Capítulo 1). No presente estudo, pretendemos verificar a identidade de *C. staigi* investigando se as três linhagens detectadas previamente são evolutivamente independentes e se outros tipos de marcadores reforçam esta divisão.

No presente estudo encontramos, a partir de três marcadores distintos, evidência da existência de três linhagens evolutivas independentes sob a denominação *C. staigi*, compatível com a existência de três possíveis espécies, o que pode ter implicações não só taxonômicas mas também práticas, como por exemplo, no seu uso como espécie bioindicadora, uma vez que as necessidades ecológicas de cada linhagem podem ser diferentes e devem ser entendidas mais a fundo.

Com os dados moleculares, encontramos resultados complementares, com o COI dividindo *C. staigi* em três linhagens independentes (que chamamos de L1-Pernambuco

/ L2-Sudeste / L3-São Paulo), enquanto o ITS2 foi capaz de separar somente duas linhagens (L1-Pernambuco / L2+L3-Sudeste + São Paulo). Numa análise filogenética, cada gene pode resultar em uma topologia diferente, já que genes diferentes estão sob distintas pressões seletivas (Wolfe *et al.* 1987), que permitem um número maior ou menor de substituições e, portanto, apresentam taxas evolutivas diferentes num mesmo intervalo de tempo (Brown *et al.* 1982). O genoma nuclear de eucariotos apresenta mecanismos de reparo que estão ausentes no genoma mitocondrial, fazendo com que o DNA mitocondrial evolua mais rápido que o nuclear, de modo que sequências nucleares sejam apropriadas para investigar a diversidade entre organismos menos aparentados enquanto as mitocondriais sejam apropriadas para investigar a divergência entre organismos que divergiram mais recentemente (Avise 1994). Essas diferenças entre os genomas ressaltam a diferença entre a Linhagem L1-Pernambuco e as outras, já que ela foi identificada tanto pelo COI como pelo ITS2.

As informações sobre *C. staigi* e *C. sulcatus* mostram sua distribuição sobreposta do Pernambuco ao Rio de Janeiro, coocorrência em diversos fragmentos florestais ou de restinga, sobreposição de nicho, comportamento, hábitos, além de padrões semelhantes de coloração corporal (Halfpter & Martínez 1967). A hipótese filogenética de COI (Figura 2.5) mostrou que, diferente de *C. staigi*, *C. sulcatus* não apresenta nenhuma evidência de que seja composta por mais de uma linhagem evolutiva. Observamos assim que *C. sulcatus* passa a ocupar um território mais amplo do que o de cada uma das linhagens de *C. staigi*. Isso demonstra que estas espécies podem ter evoluído por diferentes processos e em diferentes momentos, levando a uma diferenciação entre linhagens em *C. staigi* mas conservando *C. sulcatus* como uma única e bem adaptada espécie com ampla distribuição.

A variação dentro destas três linhagens foi compatível com o esperado para três espécies já que a divergência interespecífica foi 15X maior que a intraespecífica, bem maior que a inicialmente recomendada por Hebert *et al.* (2004). O uso das informações do banco de dados de *Barcoding* (BOLD SYSTEMS), aliado à análise de delimitação de espécies fornecida pelo programa livre ABGD, é uma ferramenta taxonômica poderosa para delimitação de espécies moleculares, vantajosa pela simplificação dos métodos de identificação através de uma análise padronizada e simples. Para acessar este *barcode*, basta amplificar o COI com os *primers* universais Pat & Jerry (Simon *et al.* 1994) e utilizar o *primer* Pat para o sequenciamento de apenas uma fita. A

aplicabilidade desse conhecimento para futuros estudos sobre *C. staigi* compreende a identificação de possíveis novas linhagens devido ao aumento da área amostrada, bem como a identificação da linhagem a que pertence o exemplar em estudo pela comparação molecular com exemplares de linhagens já conhecidas. Assim, a contribuição dos pesquisadores em alimentar o banco de dados BOLD SYSTEMS é um fator que pode contribuir significativamente nos estudos taxonômicos atuais e que deve ser incentivada.

A morfometria geométrica aplicada à análise comparada da forma das asas permitiu identificar as três linhagens de *C. staigi* de maneira correta, mostrando-se como uma boa ferramenta complementar. A variabilidade na forma multivariada identificada pelo PCA foi suficiente para sustentar a separação das linhagens. No entanto, considerando a separação das linhagens na filogenia como grupos *a priori*, foi possível fazer uma análise de Variáveis Canônicas (Figura 2.11) ou de Função Discriminante (Tabela 2.3) que separaram efetivamente as formas das linhagens. Observamos um gradiente latitudinal de tamanho entre as três linhagens, com os exemplares de São Paulo apresentando asas maiores que os de Pernambuco, com Sudeste sendo uma linhagem de forma e tamanho intermediários (Figura 2.12). Sabemos que, em geral, os animais apresentam maior tamanho conforme o aumento da latitude (Bergmann 1847), que promove mudanças nas variáveis ambientais e ecológicas que afetam os organismos. O padrão é conhecido e bastante estudado, mas os mecanismos envolvidos não são ainda totalmente compreendidos (Watt *et al.* 2010), sendo difícil analisar separadamente as componentes genéticas (adaptativas) e não-genéticas (plásticas) da variação observada (Stillwell 2010). Na avaliação das formas, as linhagens de São Paulo e Sudeste foram as mais distintas (Distância de Mahalanobis – Tabela 2.3 – e de Procrustes – dados não apresentados). Embora seja possível que tamanho e forma apresentem um mesmo padrão geral, isso não é esperado pois podem estar sob diferentes pressões seletivas (Hoffmann & Shirriffs 2002).

O dimorfismo sexual na forma da asa membranosa de *C. staigi* apresentou diferentes padrões de resultados conforme a medida de distância utilizada como critério, sendo significativo para a distância de Procrustes mas não para a distância de Mahalanobis (Tabela 2.2). Acreditamos que esta diferença pode ter surgido em função de um desenho amostral que não considerou previamente uma adequada proporção entre os sexos dos indivíduos utilizados para este estudo. Os exemplares foram

escolhidos ao acaso dentro da amostragem e posteriormente identificados os sexos, resultando em um desenho que supervalorizou o número de machos na linhagem de Pernambuco (11 machos : 0 fêmeas) em comparação às outras linhagens (Linhagem L2-Sudeste 26:36; Linhagem L3-São Paulo 7:4). Já havíamos observado ausência de dimorfismo na forma das asas em espécies de *Peltecanthon*, incluindo *C. staigi*, porém com uma amostragem totalmente localizada na linhagem do Sudeste (Capítulo 1). A relativa baixa variação na forma da asa entre espécies de Scarabaeinae reflete limitações funcionais e filogenéticas diversas (Bai *et al.* 2012) e está relacionada à evolução da morfologia corporal como um todo (Bai *et al.* 2011), que em geral é bastante conservadora em *Canthon*. Apesar de haver alguns caracteres sexuais secundários conhecidos para *Canthon* (Medina 2000; Medina *et al.* 2003) e para *C. staigi* (Halfpter & Martínez 1967), não encontramos na literatura informações sobre dimorfismo na forma da asa para esse gênero. Sendo assim, consideramos adequado trabalhar somente com os resultados da distância de Mahalanobis até que o número de exemplares amostrado seja corrigido e equilibrado entre as linhagens no futuro.

A análise da decomposição das componentes de coloração corporal pelo modelo RGB (*red-green-blue*) mostrou uma separação entre a linhagem L3-São Paulo, cujo pronoto e élitro são marcadamente mais azuis, e as linhagens de L2-Sudeste e L1-Pernambuco, cujo pronoto e élitro são mais esverdeados. Uma análise visual dos exemplares esverdeados mostrou uma ampla variação na coloração principalmente do pronoto, indo do verde ao verde-dourado. No entanto, não foi observado nenhum padrão biótico ou abiótico que possa explicar tal variação. Halfpter & Martínez (1967) chamaram a atenção para a possível influência da altitude e do bioma nos padrões de coloração, mostrando que exemplares coletados em São Paulo, Paraná ou Argentina apresentavam coloração azulada em fragmentos florestais de montanhas e esverdeada em menores altitudes. Nossa amostragem não abrange exemplares do Paraná ou Argentina, mas a observação dos exemplares da Coleção Zoológica da UFMT mostrou que para os espécimes do estado de São Paulo o padrão de coloração foi sempre o azul, independente de ser proveniente de restinga ou de montanha (Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia, a aproximadamente 720m de altitude). Assim, acreditamos que a altitude não é um fator determinante da variação de coloração em *C. staigi*, que parece estar mais relacionada a um gradiente latitudinal conforme nos mostram os diferentes marcadores utilizados neste trabalho.

Juntas, as diferentes ferramentas utilizadas para investigação da identidade de *C. staigi* nos levaram a identificar a existência de três linhagens com histórias evolutivas distintas, provavelmente sofrendo pressões seletivas diferentes considerando seu amplo território de ocorrência e diferentes tipos de habitats ocupados. Estes resultados devem servir como base para um estudo mais aprofundado da taxonomia do grupo e a possível descrição de duas novas espécies.

## CONCLUSÃO GERAL

Este estudo teve como objetivo investigar a identidade da espécie de besouro rola-bosta *C. staigi* e sua relação com suas espécies irmãs, *C. auricollis* e *C. sulcatus*, dentro do subgênero *Peltecanthon*, ampliando os conhecimentos sobre sua distribuição em fragmentos florestais e restingas da Mata Atlântica. Para isso, inferimos uma hipótese molecular do subgênero utilizando dois marcadores moleculares, um mitocondrial (COI) e um nuclear (ITS2), e avaliamos as diferenças de forma das asas posteriores utilizando a morfometria geométrica. As análises moleculares que *C. staigi* constitui um clado monofilético, evolutivamente independente do clado que contém *C. sulcatus* e *C. auricollis*. A morfometria geométrica das asas também se mostrou uma ferramenta capaz de individualizar as três espécies de *Peltecanthon* e, assim como a molecular, indicou que *C. staigi* apresenta forma mais diferenciada no subgênero, a despeito de sua morfologia ser muito semelhante a *C. sulcatus*. Estes resultados são fundamentais para embasar estudos posteriores a respeito da ecologia, distribuição e relações filogeográficas de *C. staigi*, que, apesar de morfologicamente muito semelhante a *C. sulcatus*, compõe uma linhagem filogenética independente.

Dentro de *C. staigi*, encontramos evidências de três clados evolutivamente independentes, o que nos levou a uma investigação mais aprofundada utilizando uma abordagem mista, investigando a existência de linhagens evolutivas independentes através de ferramentas moleculares (dois marcadores independentes – COI e ITS2 – e identificação de sequências de *Barcoding*), morfométricas (morfometria geométrica das asas) e dos padrões de coloração corporal. A identificação de três linhagens moleculares bem marcadas pelo DNA mitocondrial, compatíveis com a variação esperada entre possíveis três espécies e confirmada em alguns aspectos pela morfometria e pelos padrões de coloração, levanta a necessidade de uma revisão taxonômica para compreender melhor a identidade de *C. staigi*, que possivelmente sofrerá uma divisão em três novas espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi E.** 2007. Unexpected variability of millennium green: structural color of japanese jewel beetle resulted from thermosensitive porous organic multilayer. *Journal of Morphology* 268: 826-829.
- Assis OBG.** 2013. A asa da borboleta e a nanotecnologia: cor estrutural. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 35(2): 2301(1-9).
- Avise JC.** 1994. Molecular markers, natural history, and evolution. Chapman & Hall, New York, 511 pp.
- Bai M, McCullough E, Song K-E, Liu W-G, Yang X-K.** 2011. Evolutionary constraints in hind wing shape in chinese dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae). *PLoS ONE* 6(6): e21600.
- Bai M, Beutel RG, Song K-Q, Liu W-G, Malqin H, Li S, Hua X-Y, Yang X-K.** 2012. Evolutionary patterns of hind wing morphology in dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae). *Arthropod Structure & Development* 41: 505-513.
- Bergmann C.** 1847. Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien* 3: 595-708.
- Bezzerides AL, McGraw KJ, Parker RS, Hussein J.** 2007. Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1401-1408.
- Bione EG.** 2004. Citogenética em representantes da subfamília Scarabaeinae (Coleoptera-Scarabaeidae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 142pp.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC.** 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18: 225-239.
- Busse HJ, Denner EBM, Lubitz W.** 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47: 3-38.
- Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, Moura RC, Martins C.** 2011. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics* 12: 88.
- Campos JM, Almeida S.** 2016. Consequências da antropização da mata de restinga sobre a estrutura da comunidade de escarabeíneos. *In: XI Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología*, 16 a 21 de outubro de 2016, Lavras, MG - Brasil.

**Costa FC, Salomão RP, Correia RS, Pessoa KKT, Liberal CN, Filgueiras BK, Iannuzzi L.** 2008. Besouros escarabeíneos (Coleoptera, Scarabaeinae) em dois ambientes do fragmento de floresta Atlântica do Centro de Instrução Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), PE durante o período seco do ano. *In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia*, 24 a 29 de agosto de 2008, Uberlândia, MG - Brasil.

**Costa CMQ, Barreto JWM, Moura RC.** 2011. Composição da comunidade de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) em áreas de restinga do estado de Pernambuco. *In: Anais do X Congresso de Ecologia do Brasil*, 16 a 22 de setembro de 2011, São Lourenço, MG - Brasil.

**Costa FC, Pessoa KKT, Liberal CN, Filgueiras BKC, Salomão RP, Iannuzzi L.** 2013. What is the importance of open habitat in a predominantly closed forest area to the dung beetle (Coleoptera, Scarabaeinae) assemblage? *Revista Brasileira de Entomologia* 57(3): 329-334.

**Costa CMQ, Barretto JW, Moura RC.** 2014. Changes in the dung beetle community in response to restinga forest degradation. *Journal of Insect Conservation* 18: 895-902.

**Cristiano MP, Fernandes-Salomão TM, Yotoko KSC.** 2012. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie* 43: 527-538.

**Davis ALV, Scholtz CH, Philips TK.** 2002. Historical biogeography of scarabaeine dung beetles. *Journal of Biogeography* 29: 1217-1256.

**Endres AA, Creão-Duarte AJ, Hernández MIM.** 2007. Diversidade de Scarabaeidae s. str. (Coleoptera) da Reserva Biológica Guaribas, Mamanguape, Paraíba, Brasil: uma comparação entre Mata Atlântica e Tabuleiro Nordeste. *Revista Brasileira de Entomologia* 51(1): 67-71.

**Ferreira-Neto CA, Amorim IC, Cruz GAS, Moura RC.** 2014a. Análise preliminar da estrutura genética de três populações da espécie *Canthon staigi* (Scarabaeidae) ocorrentes no Nordeste brasileiro. *In: XX ENGENE – Encontro de Genética do Nordeste*, 04 a 07 de novembro de 2014, Campina Grande, PB - Brasil.

**Ferreira-Neto CA, Amorim IC, Cruz GAS, Balbino VQ, Moura RC.** 2014b. Caracterização dos tipos de microssatélites desenvolvidos a partir de biblioteca enriquecida para a espécie *Canthon staigi* (Scarabaeidae, Coleoptera). *In: XX ENGENE – Encontro de Genética do Nordeste*, 04 a 07 de novembro de 2014, Campina Grande, PB - Brasil.

**Ferreira-Neto CA, Cruz GAS, Lira-Neto AC, Balbino VQ, Moura RC.** 2016. Efeito da fragmentação florestal na diversidade genética de *Canthon (Peltecanthon) staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae). *In: XI Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología*, 16 a 21 de outubro de 2016, Lavras, MG - Brasil.

**Filgueiras BKC.** 2015. Resposta dos besouros escarabeíneos (Scarabaeidae) e borboletas frugívoras (Nymphalidae) à modificação de habitat na floresta atlântica nordestina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 156pp.

**Garrick GC, Bonatelli IAS, Hyseni C, Morales A, Pelletier TA, Perez MF, Rice E, Satler J.D, Symula RE, Thomé MTC, Carstens BC.** 2015. The evolution of phylogeographic data sets. *Molecular Ecology* 24: 1164-1171.

**Halffter G, Edmonds WD.** 1982. The nesting behavior of dung beetles (Scarabaeinae): an ecological and evolutive approach. Instituto de Ecología, Mexico, 167pp.

**Halffter G, Martínez A.** 1967. Revision Monografica de los Canthonina americano (Coleoptera, Scarabaeidae) (Ia. Parte). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. Tomo I. pp. 89-177.

**Halffter G, Martínez A.** 1977. Revision Monografica de los Canthonina americanos, IV parte. Clave para generos e y subgeneros. *Folia Entomologica Mexicana* 38: 29-107.

**Halffter G, Matthews EG.** 1966. The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae). *Folia Entomologica Mexicana* 12-14: 1-312.

**Hanski I, Cambefort Y.** 1991. Dung beetle ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 481pp.

**Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR.** 2003a. Biological identifications through DNA barcoding. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270(1512): 313-321.

**Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR.** 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270(1): S96-S99.

**Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W.** 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41): 14812-14817.

**Hernández MIM.** 2002. The night and day of dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae) in the Serra do Japi, Brazil: elytra colour related to daily activity. *Revista Brasileira de Entomologia* 46(4): 597-600.

**Hernández MIM, Barreto PSCS, Costa VH, Creão-Duarte AJ, Favila ME.** 2014. Response of a dung beetle assemblage along a reforestation gradient in Restinga forest. *Journal of Insect Conservation* 18: 539-546.

**Hodkinson ID.** 2005. Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 80(3): 489-513.

**Hoffmann AA, Shirriffs J.** 2002. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 56(5): 1068-1073.

**Huelsenbeck JP, Ronquist F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.

**Iannuzzi L, Salomão RP, Costa FC, Liberal CN.** 2016. Environmental patterns and daily activity of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in the Atlantic Rainforest of Brazil. *Entomotropica* 31(23): 196-207.

**Jinbo U, Kato T, Ito M.** 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 14: 107-124.

**Jukes TH, Cantor CR.** 1969. *Evolution of Protein Molecules*. Academic Press, New York, pp. 21-132.

**Kimura M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.

**Kinoshita S, Yoshioka S, Miyazaki J.** 2008. Physics of structural colors. *Reports on Progress in Physics* 71: 076401 (30pp).

**Korasaki V, Vaz-de-Mello FZ, Braga RF, Zanetti R, Louzada J.** 2012. Taxocenose de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) em Benjamin Constant, AM. *Acta Amazonica* 42(3): 423-432.

**Klingenberg C, McIntyre G.** 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52: 1363-1375.

**Klingenberg CP.** 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.

**Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S.** 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6): 1695-1701.

**Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B.** 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*.

**Lima RC.** 2013. Diversidade de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae), coletados em armadilha de solo com isca, na Reserva Natural Vale, Linhares – Espírito Santo, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 63pp.

**Louzada JNC, Schiffler G, Vaz-de-Mello FZ.** 1996. Efeito do fogo sobre a comunidade de Scarabaeidae (Insecta, Coleoptera) na restinga da Ilha de Guriri – ES, p 149-195. *In*: Miranda HS, Salto CH, Souza Dias BF. (eds.). Impactos de queimadas em áreas de Cerrado e Restinga. Universidade de Brasília. vi + 187p.

- Low VL, Norma-Rashid Y, Yusoff A, Vinnie-Siow WY, Prakash BK, Tan TK, Noorhidayah M, Chen CD, Sofian-Azirun M.** 2017. Pleistocene demographic expansion and high gene flow in the Globe Skimmer dragonfly *Pantala flavescens* Fabricius (Odonata: Libellulidae) in Peninsular Malaysia. *Zoologischer Anzeiger* 266: 23-27.
- Luna AE, Skigin DC, Inchaussandague ME, Alsina AR.** 2010. Structural color in beetles of South America. *Proceedings of the SPIE* 7782: 778205 (1-8).
- Medina CA.** 2000. Diagnostic and phylogenetic character variation in the genus *Canthon* Hoffmannsegg and related genera (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). Master dissertation, University of Pretoria, 95p.
- Medina CA, Scholtz CH, Gill BD.** 2003. Morphological variation and systematics of *Canthon* Hoffmannsegg 1817, and related genera of new world Canthonini dung beetles (Coleoptera, Scarabaeinae). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin - Deutsche Entomologische Zeitschrift* 50(1): 23-68.
- Medina AM, Lopes PP.** 2014. Resource utilization and temporal segregation of Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae) community in a Caatinga fragment. *Neotropical Entomology* 43: 127-133.
- Menéndez YIR, Nunes CA, Andrade F, Audino L, Cerqueira J, Louzada J.** 2016. Preferencia alimentar de las comunidades de Scarabeinae por las heces de carnívoro nativo (*Panthera onca*) durante la estación seca del bosque atlántico brasileño. *In: XI Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología*, 16 a 21 de outubro de 2016, Lavras, MG - Brasil.
- Milhomem MS, Vaz-de-Mello FZ, Diniz IR.** 2003. Técnicas de coleta de besouros copronecrófagos no Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(11): 1249-1256.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP.** 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences* 360: 1925-1933.
- Monaghan MT, Inward DJG, Hunt T, Vogler AP.** 2007. A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 674-692.
- Motoki A, Zucco LL, Sichel SE, Aires JR, Petrakis GH.** 2006. Desenvolvimento da técnica para especificação digital de cores e a nova nomenclatura para classificação de rochas ornamentais com base nas cores medidas. *Geociências* 25(4): 403-415.
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P.** 1998. Species wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.

- Nolasco-Soto J, González-Astorga J, Monteros AE, Galante-Patiño E, Favila ME.** 2017. Phylogeographic structure of *Canthon cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae), a Neotropical dung beetle in the Mexican Transition Zone: insights on its origin and the impacts of Pleistocene climatic fluctuations on population dynamics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. No prelo.
- Pereira FS.** 1953. Notas Sinonimicas (Col Scarabaeidae) Dusenias volume 4 (fascículos 5 e 6): 387-402.
- Posada D.** 2003. Selecting models of evolution. *In*: Vandemme A, Salemi M. (eds), *The Phylogenetic Handbook*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 256-282.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G.** 2011. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Molecular Ecology* 21: 1864-1877.
- Rannala B, Yang Z.** 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Ratnasingham S, Hebert PDN.** 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- Redtenbacher L.** 1867. Coleopteren. *In*: Reise des Österreichischen Fregatte Novara und die Erde in den Jahren 1857, 1858, 1859, unter der Befehlen des Commodore B. von Wüllerstorff-Urbair. Wien, Zoologischer Theil. Zweiter Band. 249p.
- Rohlf FJ.** 2016. tpsUtil, file utility program. version 1.70. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> Último Acesso em: 20 de janeiro de 2017.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP.** 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salomão RP, Iannuzzi L.** 2015. Dung beetle (Coleoptera, Scarabaeidae) assemblage of a highly fragmented landscape of Atlantic forest: from small to the largest fragments of northeastern Brazilian region. *Revista Brasileira de Entomologia* 59: 126-131.
- Salomão RP, Lira AFD, Costa FC.** 2016. Records of perching by dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) in the Northeastern Atlantic Forest of Brazil. *The Coleopterists Bulletin* 70(4): 903-906.
- Schiffler G, Vaz-de-Mello FZ, Azevedo CO.** 2003. Scarabaeidae *s.str.* (Coleoptera) do Delta do Rio Doce e Vale do Suruaca no Município de Linhares, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 5(2): 189-204.
- Schoolmeesters P, Davis ALV, Edmonds WD, Gill B, Mann D, Moretto P, Price D, Reid C, Spector S, Vaz-De-Mello FZ.** 2010. ScarabNet Global Taxon Database (version 1.5). Disponível em: <http://scarabnet.myspecies.info/scarabnet-welcome> Último acesso em: 01 de dezembro de 2016.

- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87(6): 651-701.
- Simon C, Buckley TR, Frati F, Steward JB, Beckenbach AT.** 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 545-579.
- Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN.** 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 360: 1825-1834.
- Solís A, Kohlmann B.** 2002. El género *Canthon* en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia* 10: 1-68.
- Stillwell RC.** 2010. Are latitudinal clines in body size adaptive? *Oikos* 119(9): 1387-1390.
- Szinwelski N, Fialho VS, Yotoko KSC, Seleme LR, Sperber CF.** 2012. Ethanol fuel improves arthropod capture in pitfall traps and preserves DNA. *ZooKeys* 196: 11-22.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Tarasov S, Dimitrov D.** 2016. Multigene phylogenetic analysis redefines dung beetles relationships and classification (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *BMC Evolutionary Biology* 16:257.
- Tarasov S, Génier F.** 2015. Innovative Bayesian and Parsimony Phylogeny of Dung Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Enhanced by Ontology-Based Partitioning of Morphological Characters. *PLoS ONE* 10(3): e0116671.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, Simon J-C, Fukatsu T.** 2010. Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science* 330: 1102-1004.
- 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(22): 4673-80.
- Vaz-de-Mello FZ.** 1999. Scarabaeidae *s. str.* (Coleoptera: Scarabaeoidea) de um Fragmento de Floresta Amazônica no Estado do Acre, Brasil. 1. Taxocenose. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28(3): 447-453.

- Vaz-de-Mello FZ.** 2000. Estado atual de conhecimento dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. Monografías Tercer Milenio 1: 183-195.
- Vaz-de-Mello FZ, Louzada JNC, Gavino M.** 2001. Nova espécie de *Dichotomius* Hope 1838 (Coleoptera, Scarabaeidae) do Espírito Santo, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 45(2): 99-102.
- Vieira L, Louzada JNC, Spector S.** 2008. Effects of degradation and replacement of Southern Brazilian coastal sandy vegetation on dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). Biotropica 40: 719-727.
- Villalba S, Lobo JM, Martín-Piera F, Zardoya R.** 2002. Phylogenetic relationships of Iberian dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) Insights on the evolution of nesting behavior. Journal of Molecular Evolution 55: 116-126.
- Watt C, Mitchell S, Salewski V.** 2010. Bergmann's rule: a concept cluster? Oikos 119: 89-100.
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM.** 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences 84: 9054-9058.
- Yang Z, Rannala B.** 1997. Bayesian Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: A Markov Chain Monte Carlo Method. Molecular Biology and Evolution 14: 717-724.
- Yang Z, Rannala B.** 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews Genetics 13(5): 303-14.

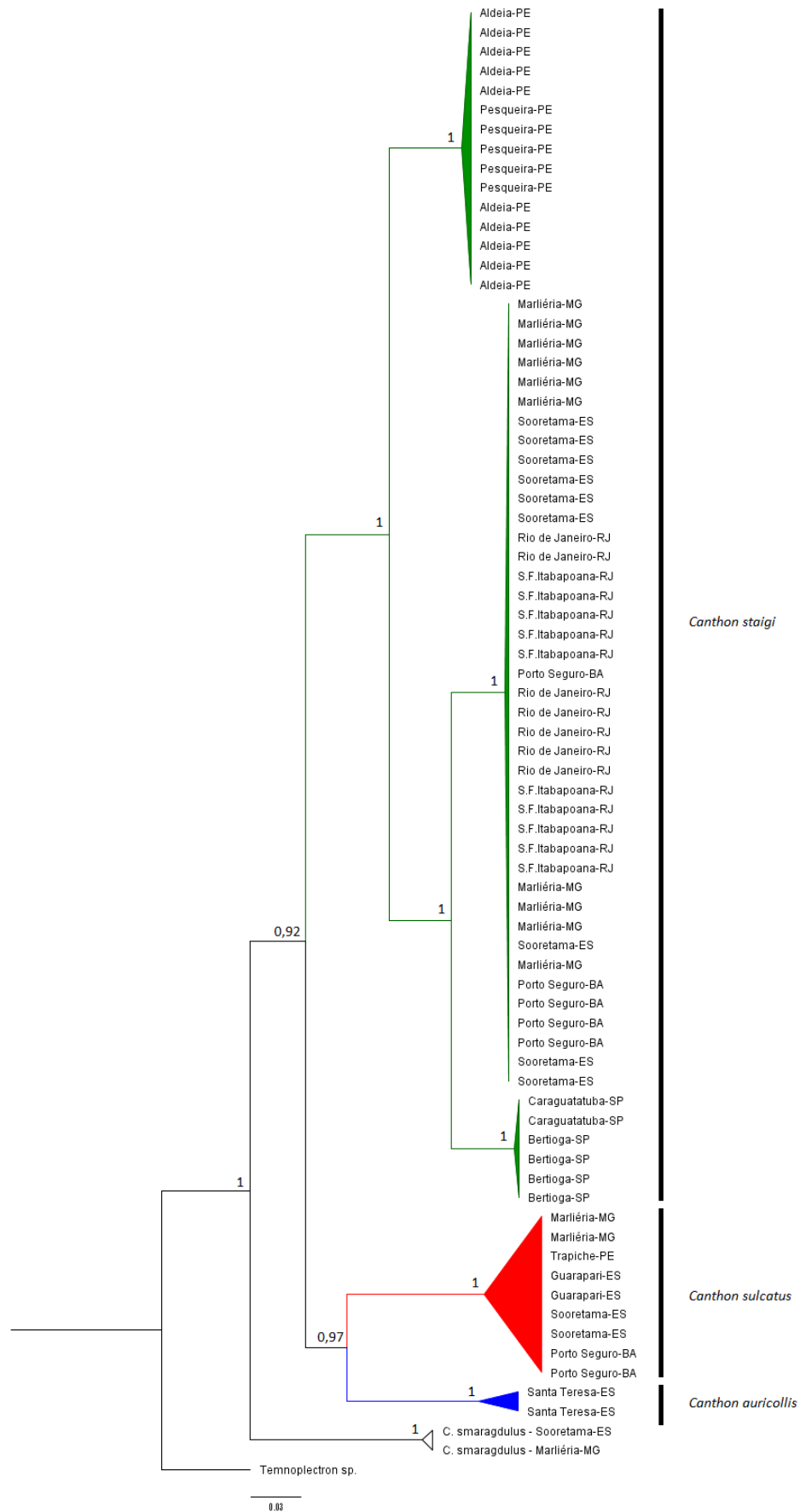
## ANEXO I

### CAPÍTULO 1

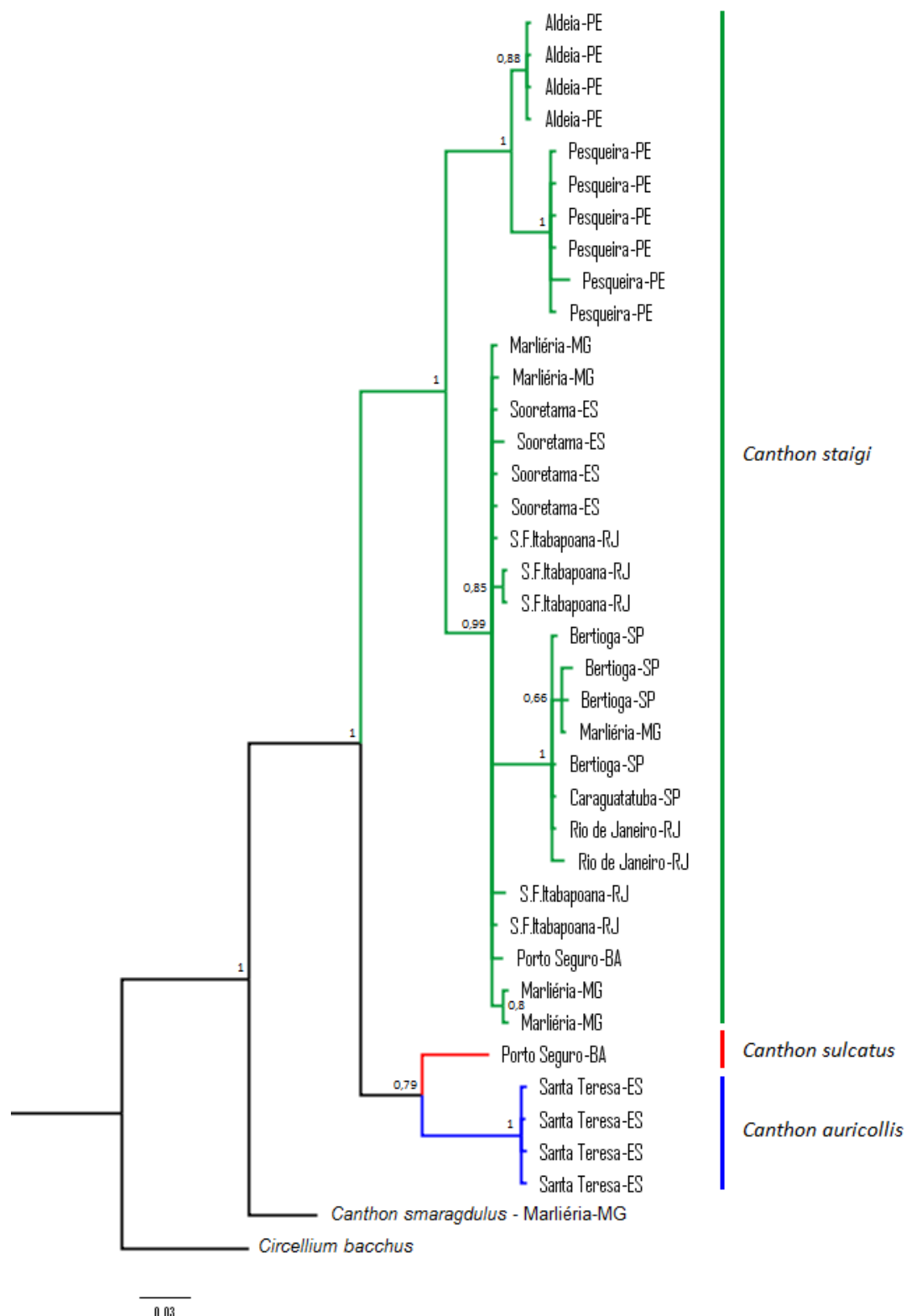
Foram amostradas ao todo 76 sequências parciais de COI, de diferentes tamanhos, sendo 62 de *C. staigi*, nove de *C. sulcatus*, duas de *C. auricollis*, duas do *outgroup* *C. smaragdulus* e uma do *outgroup* *Temnoplectron* sp. A hipótese filogenética compreendeu um alinhamento total de 981 sítios, 305 deles variáveis (Figura 3.1).

O esforço de sequenciamento e inspeção das sequências de boa qualidade resultou em uma amostragem de 32 sequências parciais de ITS2 de diferentes tamanhos para *C. staigi*, uma para *C. sulcatus*, quatro para *C. auricollis*, uma para o *outgroup* *C. smaragdulus* além da inclusão de um exemplar do *outgroup* *Circellium bacchus*. A hipótese filogenética compreendeu um alinhamento total de 492 sítios, sendo 220 deles variáveis (Figura 3.2).

**Figura 3.1:** Hipótese filogenética do gene COI obtida por Inferência Bayesiana (50 milhões de gerações com *burnin* de 25%) para espécies do subgênero *Peltecanthon*. Os valores ao lado dos nós ancestrais correspondem à probabilidade posterior (PP). Três exemplares foram utilizados como *outgroups*: uma sequência de *Temnoplectron* sp. (*GenBank* – Número de Acesso KF801975.1) e duas de *Canthon smaragdulus*. Em verde está representado o clado contendo os exemplares da espécie *Canthon staigi*, em vermelho, *Canthon sulcatus* e em azul, *Canthon auricollis*. Os nós terminais foram identificados segundo o local de coleta de cada espécime.



(Legenda na página anterior)



**Figura 3.2:** Hipótese filogenética do marcador ITS2 obtida por Inferência Bayesiana (50 milhões de gerações com *burnin* de 25%) para espécies do subgênero *Peltecanthon*. Os valores ao lado dos nós ancestrais correspondem à probabilidade posterior (PP). Dois exemplares foram utilizados como *outgroups*: uma sequência de *Circellium bacchus* (GenBank Número de Acesso JN657160.1) e uma sequência de *Canthon smaragdulus*. Em verde está representado o clado contendo os exemplares da espécie *Canthon staigi*, em vermelho, *Canthon sulcatus* e em azul, *Canthon auricollis*. Os nós terminais foram identificados segundo o local de coleta de cada espécime.

A análise do erro de digitação baseada em réplicas resultante da análise de variância ANOVA mostrou que, para o Tamanho do Centróide, a variação individual na amostragem corresponde a 99,92% da variância observada nos dados, enquanto a variação devido ao erro de digitação das réplicas (Error 1) corresponde a 0,08% da variância dos dados (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1:** Avaliação do erro de digitação em réplicas de asas posteriores de espécies de *Peltecanthon* pela análise de variância Procrustes ANOVA baseada no Tamanho do Centróide. Individual – variação devido ao efeito individual; Error 1 – variação devido ao erro de digitação; SS – soma dos quadrados; MS – média da soma dos quadrados; df – graus de liberdade; F – Estatística; p-valor (significância 0,05).

| Efeito     | % explicado | SS       | MS     | df | F       | p-valor |
|------------|-------------|----------|--------|----|---------|---------|
| Individual | 99,9175     | 171,9415 | 1,9105 | 90 | 1225,03 | <0,0001 |
| Error 1    | 0,0825      | 0,1419   | 0,0016 | 91 |         |         |
| Total      | 100         | 172,0835 |        |    |         |         |

Para o formato, a variação individual corresponde a 94,27%, enquanto para o erro de digitação, a variância explicada é de 5,73%, considerada satisfatória e validando assim os marcos anatômicos (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2:** Avaliação do erro de digitação em réplicas de asas posteriores de espécies de *Peltecanthon* pela análise de variância Procrustes ANOVA baseada na forma multivariada. Individual – variação devido ao efeito individual; Error 1 – variação devido ao erro de digitação; SS – soma dos quadrados; MS – média da soma dos quadrados; df – graus de liberdade; F – estatística; P (param) – p-valor (significância 0,05); Pillai tr. – teste de significância estatística de traço de Pillai.

| Efeito     | % de SS explicado | SS     | MS      | df   | F     | p-valor | Pillai tr. | p-valor |
|------------|-------------------|--------|---------|------|-------|---------|------------|---------|
| Individual | 94,2678           | 0,1983 | <0,0001 | 3420 | 16,63 | <0,0001 | 31,71      | <0,0001 |
| Error 1    | 5,7322            | 0,0121 | <0,0001 | 3458 |       |         |            |         |
| Total      | 100               | 0,2103 |         |      |       |         |            |         |

O teste de Normalidade Multivariada dos dados mostrou que o conjunto dos 18 marcos anatômicos apresentou distribuição normal (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3:** Avaliação da normalidade multivariada da morfometria de asas posteriores de espécies de *Peltecantho* para 18 marcos anatômicos.

|                                                | Coefficiente | Estatística | Graus de liberdade | <i>p</i> -valor |
|------------------------------------------------|--------------|-------------|--------------------|-----------------|
| Assimetria                                     | 602,1        | 9132        | 8436               | 8,92E-08        |
| Assimetria corrigida<br>para pequenas amostras | -            | 9449        | 8436               | 2,851E-14       |
| Curtose                                        | 1362         | -0,524      | -                  | 0,6003          |
| Doornik & Hansen omnibus<br>Ep. 142            | -            | -           | -                  | 1,68E-06        |

## ANEXO I

## CAPÍTULO 2

**Tabela 3.4:** Avaliação do erro de digitação em réplicas de asas posteriores de *Canthon staigi* pela análise de variância Procrustes ANOVA baseada no Tamanho do Centroide. Individual – variação devido ao efeito individual; Error 1 – variação devido ao erro de digitação; SS – soma dos quadrados; MS – média da soma dos quadrados; df – graus de liberdade; F – Estatística; *p*-valor (significância 0,05).

| Efeito    | % de SS explicado | SS       | MS     | df | F       | <i>p</i> -valor |
|-----------|-------------------|----------|--------|----|---------|-----------------|
| Indivíduo | 99,9541           | 198,6666 | 2,3936 | 83 | 2201,60 | <0,0001         |
| Error 1   | 0,0459            | 0,0913   | 0,0011 | 84 |         |                 |
| Total     | 100               | 198,7579 |        |    |         |                 |

**Tabela 3.5:** Avaliação do erro de digitação em réplicas de asas posteriores de *Canthon staigi* pela análise de variância Procrustes ANOVA baseada na forma multivariada. Individual – variação devido ao efeito individual; Error 1 – variação devido ao erro de digitação; SS – soma dos quadrados; MS – média da soma dos quadrados; df – graus de liberdade; F – Estatística; *p*-valor (significância 0,05); Pillai tr. – teste de significância estatística de traço de Pillai.

| Efeito    | % de SS explicado | SS     | MS      | df   | F      | <i>p</i> -valor | Pillai tr. | <i>p</i> -valor |
|-----------|-------------------|--------|---------|------|--------|-----------------|------------|-----------------|
| Indivíduo | 93,1740           | 0,1375 | <0,0001 | 3154 | 143,81 | <0,0001         | 30,78      | <0,0001         |
| Error 1   | 6,8260            | 0,0101 | <0,0001 | 3192 |        |                 |            |                 |
| Total     | 100               | 0,1476 |         |      |        |                 |            |                 |

**Tabela 3.6:** Avaliação da normalidade multivariada da morfometria de asas posteriores de *Canthon staigi*.

|                                                | Coeficiente | Estatística | Graus de Liberdade | <i>p</i> -valor |
|------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------------|-----------------|
| Assimetria                                     | 915,4       | 1,282E04    | 1,324E04           | 0,996           |
| Assimetria corrigida<br>para pequenas amostras | -           | 1,33E04     | 1,324E04           | 0,3749          |
| Curtose                                        | 1780        | -5,113      | -                  | 3,175E-07       |
| Doornik & Hansen omnibus<br>Ep. 157,4          | -           | -           | -                  | 2,211E-06       |