

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA CAROLINE BUSS

FILOGENIA E TEMPO EVOLUTIVO DE PIESTINAE ERICHSON, 1839
(COLEOPTERA, STAPHYLINIDAE): UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM
DADOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS

CURITIBA

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA CAROLINE BUSS

FILOGENIA E TEMPO EVOLUTIVO DE PIESTINAE ERICHSON, 1839
(COLEOPTERA, STAPHYLINIDAE): UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM
DADOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas (Entomologia), do Setor
de Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Edilson Caron

Co-orientador: Dr. Leonardo Foti (Fiocruz/PR)

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Buss, Bruna Caroline, 1997-

Filogenia e tempo evolutivo de Piestinae Erichson, 1839
(Coleoptera, Staphylinidae) : uma abordagem integrativa com
dados moleculares e morfológicos / Bruna Caroline Buss. –
Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Entomologia).

Orientador: Dr. Edilson Caron.

Coorientador: Dr. Leonardo Foti (Fiocruz/PR)

1. Estafilíneo. 2. Análise cladística. 3. Filogenia. 3. Inseto -
Evolução. I. Caron, Edilson, 1981-. II. Foti, Leonardo. III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BRUNA CAROLINE BUSS**, intitulada: **FILOGENIA E TEMPO EVOLUTIVO DE PLEISTOCENO ERICHSON, 1839 (COLEOPTERA, STAPHYLINIDAE): UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM DADOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS**, sob orientação do Prof. Dr. EDILSON CARON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Maio de 2025.

Assinatura Eletrônica

09/05/2025 08:54:26.0

EDILSON CARON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/05/2025 11:41:12.0

BRUNO ZILBERMAN

Avaliador Externo (MUSEU DE ZOOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

09/05/2025 13:05:55.0

BRUNO CLARKSON MATTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE
FLUMINENSE DARCY RIBEIRO)

Assinatura Eletrônica

12/05/2025 09:33:57.0

FERNANDO WILLYAN TREVISAN LEIVAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Edilson Caron, pela orientação, paciência e pelos ensinamentos inestimáveis ao longo desse caminho.

Ao meu co-orientador, Dr. Leonardo Foti, por aceitar este desafio e, com entusiasmo contribuir para uma pesquisa em uma temática distinta de sua linha de trabalho. Sua disposição em compartilhar conhecimento, confiança e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e à Universidade Federal do Paraná, pelo suporte e pelas oportunidades de aprendizado e crescimento profissional.

Ao CNPq e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Gabriel Melo e ao Dr. Marcos Fianco, pelos ensinamentos e ajuda com as análises de tempo de divergência.

À todos os professores que me acompanharam ao longo dessa jornada acadêmica, por todo o conhecimento e inspiração.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Sistêmica de Tripanossomatídeos do Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ/PR, por ceder o espaço e fornecer o suporte necessário para a realização de minha pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, que hoje posso chamar de amigos, pela ajuda mútua, pelas discussões científicas, pelas trocas de experiências e pelas horas de dedicação compartilhadas.

À toda minha família, pelo apoio incondicional e pelo incentivo em todas as fases deste percurso. Vocês são minha maior fonte de inspiração e força.

Finalmente, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tese fosse realizada. Cada um de vocês deixou sua marca em meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

"Na ciência, não há atalhos para a verdade. Observação e paciência são os únicos caminhos a seguir."

— Marie Skłodowska-Curie

RESUMO

Piestinae Erichson, 1839 representa uma subfamília de Staphylinidae composta por 115 espécies distribuídas em 9 gêneros. Historicamente, foi delimitada com base em características homoplásticas e inicialmente designada como um agrupamento para diversos besouros que não se enquadravam em outras subfamílias. Nos últimos anos Piestinae tem sido estudada com base em dados morfológicos para investigar a monofilia da subfamília, assim como a monofilia e a posição sistemática de seus gêneros. Com relação a esses estudos, dois deles divergem quanto a monofilia de Piestinae. Portanto, os objetivos deste estudo foram testar a monofilia da subfamília utilizando novos métodos: (1) informações moleculares de cinco genes específicos: citocromo c oxidase subunidade I (COI), 28S rDNA (28S), Wingless (Wg), arginina quinase (ArgK) e carbamoil-fosfato sintase (CAD); e (2) integrando dados moleculares e morfológicos em uma abordagem de evidência total. Além disso, tivemos como último objetivo: (3) estimar os tempos de divergência entre os principais clados de Piestinae e outras subfamílias da linhagem Oxytelinae. As relações filogenéticas foram inferidas por meio de métodos de inferência bayesiana e máxima verossimilhança. A monofilia de Piestinae não foi recuperada apenas com dados moleculares, porém foi estabelecida em análise de evidência total. Dois clados foram identificados: Clado A: *Eupiestus* + (*Hypotelus* + *Piestus*) e Clado B: *Siagonium* + *Prognathoides*. Com relação a linhagem Oxytelinae, nossos resultados corroboram trabalhos anteriores e estabelecem Scaphidiinae como grupo irmão do clado Oxytelinae+(Piestinae+Osoriinae). Já nossos resultados de tempo evolutivo indicam que a divergência de Staphylinidae se iniciou provavelmente ao longo do Mesozoico (219,58 Ma), com a linhagem Oxytelinae se diferenciando no Jurássico (173,30 Ma) e Piestinae apresentando sua divergência principal no Cretáceo Tardio (83,81 e 97,80 Ma).

Palavras-chave: divergência evolutiva, estafilínídeos, evolução, grupo Oxytelinae, piestíneos, sistemática filogenética.

ABSTRACT

Piestinae Erichson, 1839 represents a subfamily of Staphylinidae composed of 115 species distributed in 9 genera. Historically, it was delimited based on homoplastic characters and was initially designated as a grouping for several beetles that did not fit into other subfamilies. In recent years, Piestinae has been studied based on morphological data to investigate the monophyly of the subfamily, as well as the monophyly and systematic position of its genera. Regarding these studies, two of them disagree on the monophyly of Piestinae. Therefore, the objectives of this study were to test the monophyly of the subfamily using new methods: (1) molecular data from five specific genes: cytochrome c oxidase subunit I (COI), 28S rDNA (28S), Wingless (Wg), arginine kinase (ArgK) and carbamoyl-phosphate synthase (CAD); and (2) integrating molecular and morphological data in a total evidence approach. Additionally, as a final objective: (3) to estimate the divergence times among the main clades of Piestinae and other subfamilies of the Oxytelinae lineage. Phylogenetic relationships were inferred using Bayesian Inference and Maximum Likelihood methods. The monophyly of Piestinae was not recovered with molecular data alone but was established in a total-evidence analysis. Two clades were identified: Clade A: *Eupiestus* + (*Hypotelus* + *Piestus*) and Clade B: *Siagonium* + *Prognathoides*. Concerning the Oxytelinae lineage, our results corroborate previous studies and establish Scaphidiinae as the sister group of the Oxytelinae+(Piestinae+Osoriinae) clade. Our evolutionary time results indicate that the divergence of Staphylinidae likely began throughout the Mesozoic (219,58 Ma), with the Oxytelinae lineage differentiating in the Jurassic (173,30 Ma) and Piestinae presenting its main radiation in the Late Cretaceous (83,81 and 97,80 Ma).

Keywords: divergence times, staphylinids, evolution, Oxytelina group, piestines, Phylogenetic systematics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema filogenético para o grupo Staphylinidae, baseado em Lawrence e Newton (1982), Ashe e Newton (1993), Welch (1993), Newton e Thayer (1995), Hansen (1997). Fonte: Thayer, 2005.....	13
Figura 2.	Hipótese de relacionamento filogenético apresentado por Grebennikov e Newton (2012) para a linhagem Oxyteline, baseada em 240 caracteres morfológicos de adultos e larvas.....	15
Figura 3.	Adultos de alguns representantes das quatro subfamílias da linhagem Oxyteline (Imagens: Silva, 2020 e LAPCOL).....	16
Figura 4.	Hipóteses da composição do Grupo Oxyteline e posição de Piestinae. (A) Após Thayer (2005); (B) Após Grebennikov e Newton (2012). Fonte: Silva (2020).....	25
Figura 5.	Hipótese de relacionamento filogenético apresentado por McKenna et al. (2015a) para Staphylinidae, resultante de análise de Inferência Bayesiana com base em dois marcadores moleculares (28S e CAD), totalizando 3430 pb.....	26
Figura 6.	Filograma de Maxima Verossimilhança das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG da linhagem Oxyteline. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.....	41
Figura 7.	Filograma de maioria da análise de inferência bayesiana das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG da linhagem Oxyteline pós-burnin de 25%. Valores de probabilidade posterior são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.....	42

- Figura 8.** Consenso Bayesiano dos dados combinados dos marcadores 28S, COI, Wingless, Argk e CAD, e seis pontos de calibração, de Staphylinidae + Agyrtidae (Coleoptera). Valores correspondem ao tempo médio dos nós, barras indicam o intervalo de 95% das maiores densidades posteriores dos tempos de divergências estimados para os nós de interesse. 1 e 2 (triângulos) correspondem a pontos de calibração secundária: 1 = raiz; 2 = Agyrtidae. 1-4 (estrelas) correspondem à pontos de calibração baseados em fósseis: 1 = *Oxyporus yixianus*; 2 = *Stenus (Nestus) imputribilis*; 3 = *Sinoxytelus euglypheus* e 4 = *Propiestus archaicus*..... 54
- Figura 9.** Filograma de Máxima Verossimilhança das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG, concatenadas com uma matriz de dados morfológicos (238 caracteres: 164 de adulto e 74 de larva) da linhagem Oxytelinae. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores..... 63
- Figura 10.** Destaque para a subfamília Piestinae do Filograma de Máxima Verossimilhança em análise de total evidência, combinando 28S, CAD, Argk, COI e WG, concatenadas com a matriz de dados morfológicos (238 caracteres: 164 de adulto e 74 de larva) da linhagem Oxytelinae. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores..... 65
- Figura 11.** Esquemas filogenéticos propostos por diferentes autores, representando hipóteses alternativas de relações evolutivas para Piestinae. 1: Grebennikov e Newton (2012), dados morfológicos de adultos; 2: McKenna et al. (2015a), dados moleculares; 3: Silva (2020), dados morfológicos de adultos; 4: Buss (2025), evidência total, realizada nesse estudo..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Visão geral dos gêneros da subfamília Piestinae atualmente reconhecidos no mundo segundo Silva, 2020; Caron et al., 2025 e Caron et al., (no prelo).....	24
Tabela 2.	Táxons amostrados para os dados moleculares. Números de acesso são indicados para as sequências obtidas no GenBank; “Inédita” indica sequências obtidas neste trabalho. “–” indica os dados faltantes.....	31
Tabela 3.	Marcadores moleculares utilizados neste estudo com respectivos protocolos de PCR.....	37
Tabela 4.	Pontos de calibração fóssil e parâmetros dos priors implementados no BEAST2 para as corridas de MCMC.....	52
Tabela 5.	Tempos de divergência e valores de suporte dos clados mais importantes. Idades em milhões de anos (Ma). Valores de suporte representando bootstrap ultra-rápido obtido pela Máxima Verossimilhança e a Probabilidade Posterior (PP – %) da Inferência Bayesiana.....	55
Tabela 6.	Lista de táxons selecionados para a matriz morfológica e respectivos terminais selecionados da matriz molecular para compor as quimera.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11-22
CAPÍTULO 1.....	23-47
Filogenia molecular multilocus de Piestinae e implicações evolutivas no grupo oxytelinae (Coleoptera, Staphylinidae).....	23
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
CAPÍTULO 2.....	48-5
Estimativas de Tempo de Divergência em Piestinae (Coleoptera, Staphylinidae): Implicações Evolutivas.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
OBJETIVOS.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
CAPÍTULO 3.....	57-68
Filogenia de Piestinae (Coleoptera, Staphylinidae) com base em evidência total: Integração de dados morfológicos e moleculares.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
OBJETIVOS.....	60
MATERIAL E MÉTODO.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE 1.....	82

INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Coleoptera Linnaeus, 1758, é a mais diversa dentro da classe Insecta, representando aproximadamente 40% da diversidade total de insetos, com mais de 380.000 espécies conhecidas (GRIMALDI; ENGEL, 2005; BEUTEL et al., 2019; CAI et al., 2022; NEWTON, 2025). Ela é composta por quatro subordens: Archostemata Kolbe, 1908, Myxophaga Crowson, 1955, Adephaga Schellenberg, 1806 e Polyphaga Emery, 1886. Dentre esses, Adephaga e Polyphaga são os mais proeminentes, abrangendo mais de 99% das espécies conhecidas.

A subordem Polyphaga é, de longe, a mais diversa, incluindo mais de 300.000 espécies, com grupos de grande importância ecológica e econômica, como Scarabaeidae, Chrysomelidae, Curculionidae e Staphylinidae, enquanto Adephaga reúne mais de 40.000 espécies, com representantes conhecidos como os Carabidae, Dytiscidae, entre outras (CAI et al., 2022; CARON et al., 2024; NEWTON, 2025). Em contrapartida, Archostemata, com cerca de 50 espécies atuais descritas, é composta por besouros xilófagos de distribuição restrita, enquanto Myxophaga, com aproximadamente 100 espécies, inclui besouros aquáticos ou semi-aquáticos de tamanho reduzido (CATERINO et al., 2002; BOUCHARD et al., 2017; NEWTON, 2025).

A aquisição de determinadas características-chave podem ter influenciado na diversidade atual dos Coleoptera, entre essas inovações, a hipótese mais amplamente aceita para explicar o sucesso evolutivo dos besouros envolve o desenvolvimento dos élitros protetores, os quais possibilitam a ocupação de micro-habitats inacessíveis a outros artrópodes terrestres. Além disso, a capacidade de explorar uma ampla gama de recursos alimentares, aliada à versatilidade em colonizar diferentes ambientes terrestres e aquáticos, tem sido fundamental para o sucesso adaptativo do grupo (MCKENNA et al., 2015b; BOUDINOT et al., 2022; GOCZAŁ; BEUTEL, 2023; FERREIRA et al., 2023). A diversidade de Coleoptera é resultado de uma longa história evolutiva associada a adaptações a diferentes nichos ecológicos. Estudos como os de McKenna et al. (2015a, 2015b) sugerem que a divergência inicial dos besouros está relacionada à associação com plantas angiospermas durante o Cretáceo, o que pode ter impulsionado a grande diversidade da subordem Polyphaga.

Dentro de Polyphaga, algumas famílias se destacam pela alta diversidade, sendo Staphylinidae uma das mais expressivas. Descrita por Latreille (1802) a família compreende atualmente mais de 66.000 espécies documentadas em 4.038 gêneros, organizadas em 35 subfamílias (NEWTON, 2025). Representando uma das maiores radiações de Metazoários em termos de número de espécies descritas (GREBENNIKOV; NEWTON, 2009; AHN et al. 2017; ŽYLA; SOLODOVNIKOV, 2019). Os Staphylinidae ocupam uma vasta gama de habitats e microhabitats em todos os continentes e principais ilhas, exceto na Antártica (THAYER, 2016). Sua notável riqueza de espécies, aliada à ampla plasticidade ecológica, faz dessa família um dos grupos mais bem-sucedidos da ordem.

Esses organismos, em sua maioria, atuam como predadores em serapilheira e matéria vegetal em decomposição, e exploram uma variedade de microhabitats, como fungos, ninhos de invertebrados e vertebrados, costas marítimas, além disso, alguns estafilínídeos se alimentam de ectoparasitas de pequenos mamíferos ou parasitóides associados a pupários de moscas (THAYER, 2016).

Além de sua diversidade de hábitos, os estafilínídeos apresentam notável variação morfológica. Um dos aspectos mais característicos do grupo é, em sua maioria, a presença de élitros curtos e truncados, permitindo que mais da metade do abdômen flexível permaneça exposto, com seis ou ocasionalmente sete ventritos abdominais visíveis e, com poucas exceções, procoxa contíguas (NEWTON et al., 2000).

Do ponto de vista evolutivo, a família Staphylinidae é considerada uma das linhagens mais antigas da subordem Polyphaga, como indicado por análises de relógio molecular (ZHANG; ZHOU, 2013; MCKENNA et al., 2015b; CAI et al., 2022). Estudos recentes sugerem que a linhagem teve origem entre o Triássico Tardio e o Jurássico Inicial (209–184 milhões de anos atrás).

A constituição e a relação entre os clados em Staphylinidae, bem como a delimitação de suas unidades taxonômicas, foram discutidas ao longo dos anos e permanecem controversas (GANGLBAUER, 1895; COIFFAIT, 1972; LAWRENCE; NEWTON, 1982; NAOMI, 1985; NEWTON; THAYER, 1988; HANSEN, 1997; CATERINO et al., 2005; THAYER, 2016).

Lawrence e Newton (1982) sintetizaram a classificação dos Coleoptera e sugeriram que as 22 subfamílias de estafilínídeos, reconhecidas até então, poderiam ser organizadas em quatro linhagens principais, ou grupos informais:

Omaline, Tachyporine, Staphylinine e Oxytelinae (figura 1). Pesquisas subsequentes focadas na classificação, sistemática e filogenia de Staphylinidae foram realizadas com o intuito de elucidar a história evolutiva dessas quatro linhagens principais (THAYER, 2005).

O grupo Omaline foi reconhecido como monofilético através do estudo de Newton e Thayer (1995), com base em 112 caracteres morfológicos de adultos, no qual também reclassificaram a antiga família Pselaphidae Latreille, 1802 em uma subfamília bem aninhada dentro desse grupo. Além disso, corroboraram a inclusão de Microsilphinae, Glypholomatinae, Micropeplinae e Dasycerinae nesta linhagem.

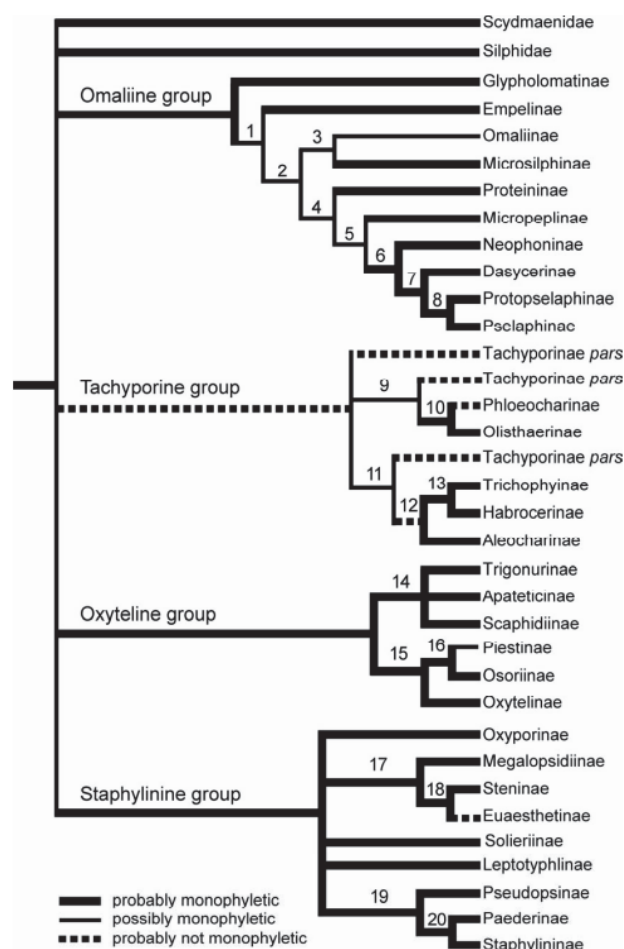


Figura 1. Esquema filogenético para o grupo Staphylinidae, baseado em Lawrence e Newton (1982), Ashe e Newton (1993), Welch (1993), Newton e Thayer (1995), Hansen (1997). Fonte: Thayer, 2005.

A filogenia do grupo Tachyporine foi investigada por Ashe e Newton (1993) e Ashe (2005), com base em características morfológicas de larvas e adultos. Embora a monofilia desse grupo não tenha sido estabelecida e suas relações basais não

tenham sido completamente resolvidas, eles consideraram as subfamílias Tachyporinae, Aleocharinae, Phloeocharinae, Olisthaerinae, Trichophyinae e Habrocerinae como parte desse grupo.

O grupo Staphylinine, em contrapartida, foi objeto de estudos mais abrangentes em comparação com as outras linhagens. Foi reconhecido como um grupo monofilético, englobando as subfamílias Oxyporinae, Megalopsidinae, Steninae, Euaesthetinae, Leptotyphlinae, Paederinae e Staphylininae, por meio de caracteres morfológicos de adultos e larvas, conforme apresentado em trabalhos de Lawrence e Newton (1982), Newton e Thayer (1995), Hansen (1997), Grebennikov e Newton (2012), Thayer (2016), além de análises moleculares de pequenas amostras de dados por Ballard et al. (1998) e McKenna et al. (2015a). Grebennikov e Newton (2009) também incluíram formalmente a antiga família Scydmaenidae Leach, 1815 como uma subfamília bem integrada dentro desse grupo.

A linhagem Oxyteline, proposta por Lawrence e Newton (1982) era composta por Piestinae Erichson, 1839, Oxytelinae Fleming, 1821, Osoriinae Erichson, 1839 e possivelmente Scaphidiidae Latreille, 1806, que na época era considerada uma família independente, mas foi posteriormente reconhecida formalmente como uma subfamília de Staphylinidae (primeiramente sugerido por KASULE, 1966 e corroborado por LESCHEN; LÖBL, 1995). Newton e Thayer (1992) em uma revisão de nomes de grupos familiares em Staphyliniformia, com comentários sobre classificação, reconheceram Apateticinae Fauvel, 1895 e Trigonurinae Reiche, 1865 como subfamílias em vez de tribos de Piestinae, adicionando essas duas subfamílias também a linhagem (ver THAYER, 2005).

A análise filogenética do grupo Oxyteline foi predominantemente conduzida por Grebennikov e Newton (2012), utilizando 240 caracteres morfológicos de adultos e larvas. Nessa investigação, identificaram que Apateticinae e Trigonurinae, posicionavam-se na base de Staphylinidae, afastando-se do grupo. Dessa forma, reconheceram a linhagem em um sentido mais restrito, composta por Scaphidiinae, Osoriinae, Oxytelinae, e Piestinae (figura 2).

Atualmente composto por quatro subfamílias (segundo GREBENNIKOV; NEWTON, 2012), o grupo Oxyteline representa a menor das quatro linhagens, com um total de 5.943 espécies descritas, distribuídas em 215 gêneros (NEWTON, 2025). As espécies desse grupo variam em tamanho, geralmente de pequeno a moderado (1–10 mm de comprimento), e apresentam morfologia diversificada,

incluindo élitros que podem ser curtos ou longos (figura 3). Essas espécies habitam uma ampla gama de ambientes, sendo frequentemente associadas a árvores e materiais em decomposição (LAWRENCE; NEWTON, 1982; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; THAYER, 2016).

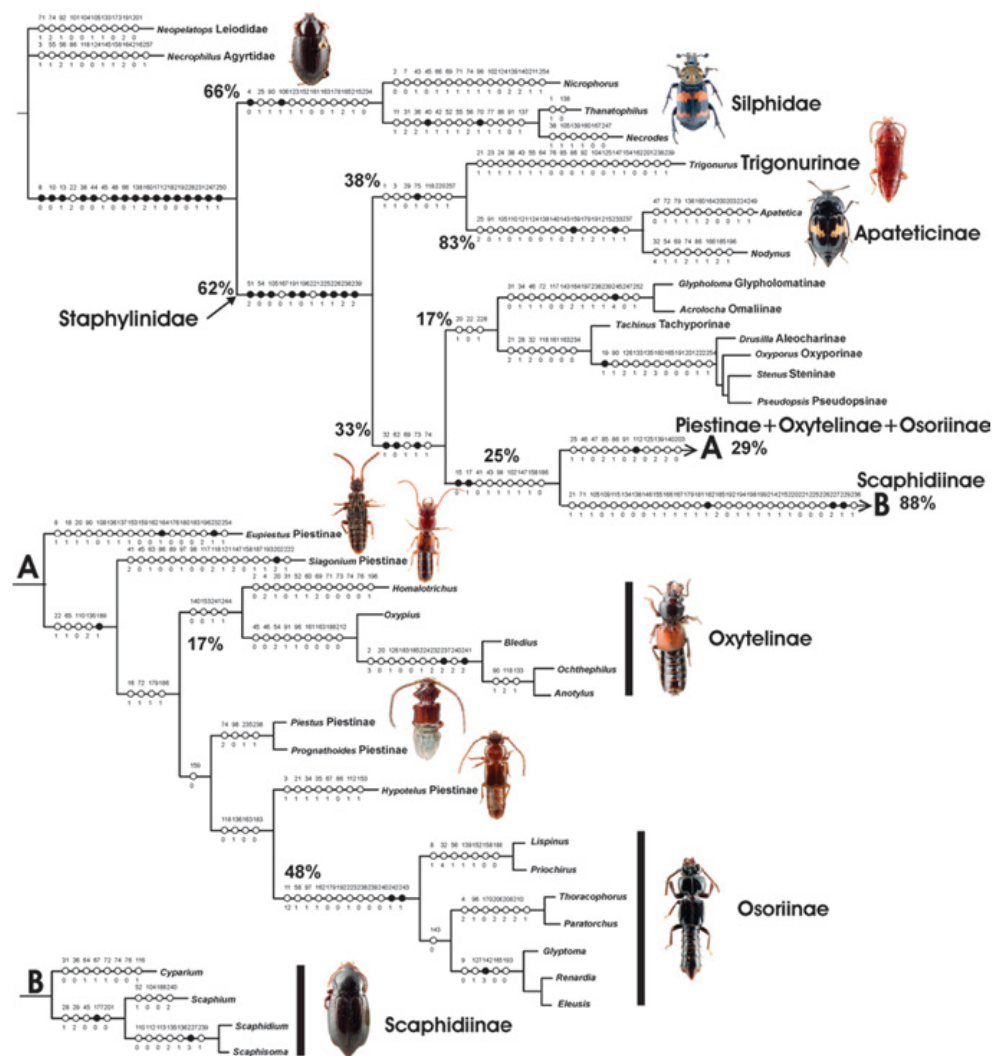


Figura 2. Hipótese de relacionamento filogenético apresentado por Grebennikov e Newton (2012) para a linhagem Oxytelinae, baseada em 240 caracteres morfológicos de adultos e larvas.

A análise filogenética conduzida por Grebennikov e Newton (2012) também esclareceu a posição do Grupo Oxytelinae dentro de Staphylinidae, indicando que a divergência da família provavelmente ocorreu durante a transição do comportamento alimentar de grupos onívoros/saprófagos para grupos carnívoros (embora casos de reversão e paralelismo tenham sido identificados).

No que diz respeito às subfamílias, Oxytelinae foi demonstrada como monofilética por Herman (1970), notadamente pela presença sinapomórfica de um único par de glândulas defensivas no ápice abdominal. As relações filogenéticas entre as tribos e gêneros desta subfamília foram iniciadas no estudo de Herman e parcialmente ampliadas por Newton (1982) e Makranczy (2006). Com respeito aos Scaphidiinae, a monofilia e as relações internas entre tribos e gêneros foram exploradas por Leschen e Löbl (1995). Para Osoriinae, embora não tenhamos uma monofilia testada, ela é apoiada por Grebennikov e Newton (2012).

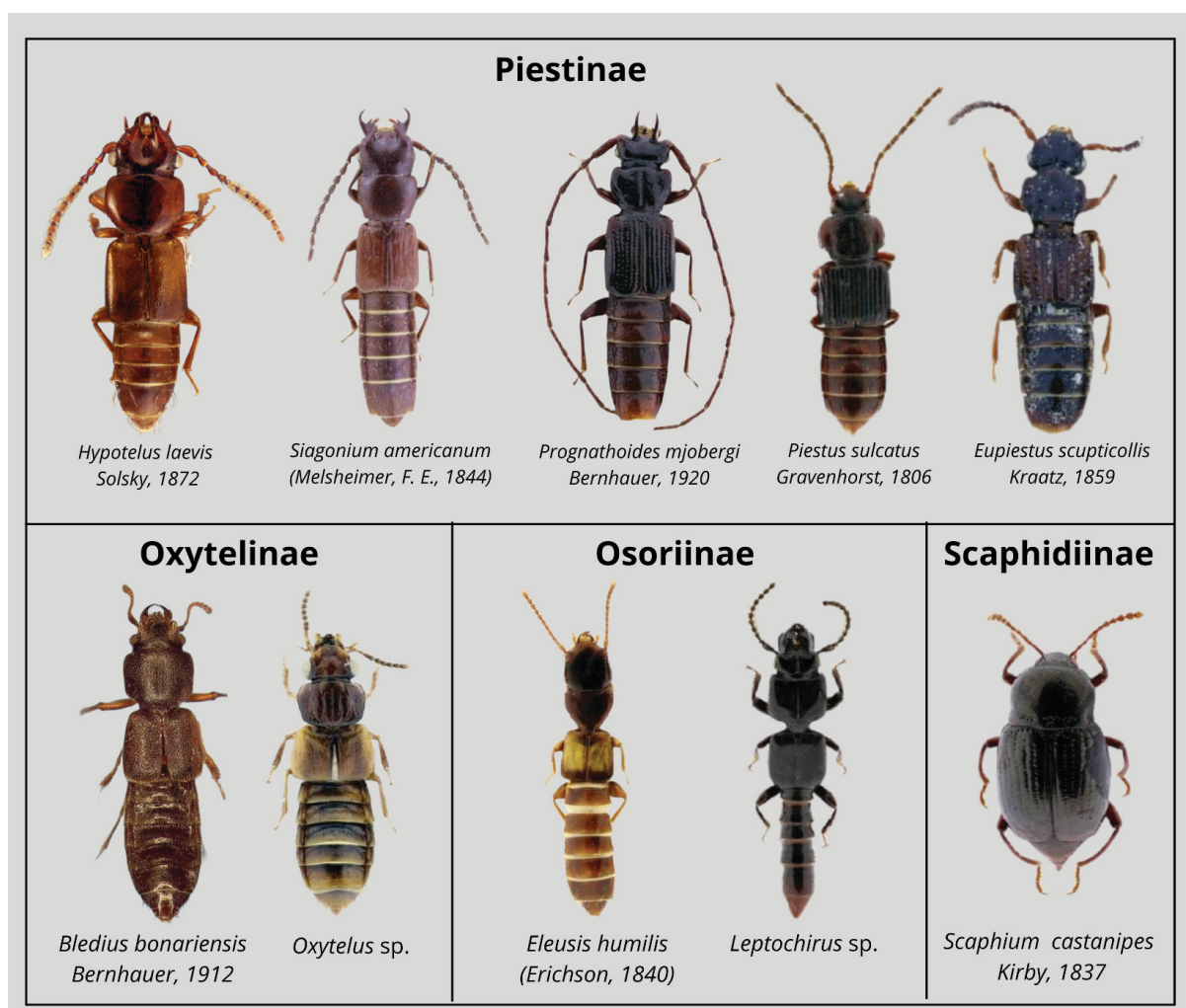


Figura 3. Adultos de alguns representantes das quatro subfamílias da linhagem Oxytelinae (Imagens: Silva, 2020 e LAPCOL).

Quanto à Piestinae, esta foi a única entre as quatro subfamílias cuja monofilia não foi apoiada. Estudos anteriores já indicavam sua parafilia e polifilia (GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; MCKENNA et al., 2015a), mesmo após a remoção das tribos Apateticini e Trigonurini. Historicamente, a subfamília foi definida

com base em caracteres plesiomórficos e, em períodos anteriores, funcionava como um agrupamento para estafilínídeos diversos que não se encaixavam em outras categorias taxonômicas (CARON et al., 2012).

Os representantes de Piestinae são geralmente encontrados sob cascas de árvores e em madeira em decomposição, sendo seu registro na serapilheira menos frequente (CARON et al., 2012). As informações sobre a biologia dessas espécies ainda são escassas, mas presume-se que a maioria delas atue como saprófaga, havendo também indícios de comportamento micófago em algumas espécies (THAYER, 2016). Um aspecto morfológico interessante em determinados piestinos é a presença de pequenas invaginações mandibulares, estruturas semelhantes às observadas em escotilíneos e cucujóides, as quais podem funcionar como micângios para o transporte de esporos fúngicos (CROWSON; ELLIS, 1969).

Embora estudos mais recentes (CARON et al., 2012; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; BORTOLUZZI et al., 2017; Caron et al., 2025) tenham refinado o conceito de Piestinae, tornando o grupo menos heterogêneo, ainda persistem várias incertezas taxonômicas e filogenéticas em relação a essa subfamília. Nesse contexto, este estudo tem como objetivo expandir o conhecimento sobre Piestinae por meio da análise de novos dados. Ao integrar métodos de inferência filogenética com evidências morfológicas e moleculares, buscamos avaliar a monofilia de Piestinae e esclarecer suas relações evolutivas dentro de Staphylinidae, contribuindo para um entendimento mais robusto da sistemática do grupo.

Portanto, este trabalho teve três objetivos principais. O primeiro foi testar a monofilia de Piestinae, gerando uma hipótese de relacionamento filogenético da subfamília com base em dados moleculares. O segundo objetivo consistiu em realizar uma análise de tempo evolutivo, estimando o tempo de divergência para Piestinae e outras subfamílias da linhagem Oxytelinae. Por fim, o terceiro objetivo foi avaliar a monofilia da subfamília por meio de uma abordagem de total evidência, integrando dados moleculares e morfológicos buscando uma compreensão mais robusta das relações filogenéticas dentro da subfamília. Desta forma, esta tese está dividida em três capítulos, cada um correspondendo aos objetivos apresentados anteriormente.

REFERÊNCIAS

- AHN, K.-J. et al. Checklist of the Staphylinidae (Coleoptera) in Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, v. 10, p. 279–336, 2017.
- ASHE, J. S. Phylogeny of the tachyporine group subfamilies and "basal" lineages of the Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae) based on larval and adult characteristics. *Systematic Entomology*, v. 30, p. 3-37, 2005.
- ASHE, J. S.; NEWTON, A. F. Larvae of *Trichophya* and phylogeny of the tachyporine group of subfamilies (Coleoptera: Staphylinidae) with a review, new species and characterization of the *Trichophyinae*. *Systematic Entomology*, v. 18, p. 267-286, 1993.
- BALLARD, J. W. O. et al. Data sets, partitions, and characters: philosophies and procedures for analyzing multiple data sets. *Systematic Biology*, v. 47, p. 367-396, 1998.
- BEUTEL, R. G. et al. The phylogeny of Coleopterida (Hexapoda)—morphological characters and molecular phylogenies. *Systematic Entomology*, v. 44, n. 1, p. 75-102, 2019.
- BORTOLUZZI, S.; CARON, E.; RIBEIRO-COSTA, C. S. Revision and phylogeny of *Hypotelus* Erichson: a Neotropical genus of minute rove beetles (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae). *Zootaxa*, v. 4273, p. 451-487, 2017.
- BOUDINOT, B. E. et al. Systematic bias and the phylogeny of Coleoptera—A response to Cai et al.(2022) following the responses to Cai et al.(2020). *Systematic Entomology*, v. 48, n. 2, p. 223-232, 2023.
- BOUCHARD, P. et al. Biodiversity of Coleoptera. In: *Insect biodiversity: science and society*. p. 337-417, 2017.
- CAI, C. et al. Integrated phylogenomics and fossil data illuminate the evolution of beetles. *Royal Society Open Science*, v. 9, n. 3, p. 211771, 2022.

CARON, E. et al. Coleoptera of Brazil: what we knew then and what we know now. Insights from the Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. *Zoologia (Curitiba)*, v. 41, p. e23072, 2024.

CARON, E.; MCCLARIN, J.; BUSS, B. C.; FOTI, L. Combining molecular and morphological data to test the monophyly of *Hypotelus* Erichson and description of new species from Ecuador (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae). *Zootaxa*, 5631(3), 548-560, 2025.

CARON, E.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; NEWTON, A. F. Cladistic analysis and revision of *Piestus* Gravenhorst, with remarks on related genera (Coleoptera: Staphylinidae: Piestinae). *Invertebrate Systematics*, v. 25, p. 490-585, 2012.

CATERINO, M. S. et al. Basal relationships of Coleoptera inferred from 18S rDNA sequences. *Zoologica Scripta*, v. 31, n. 1, p. 41-49, 2002.

CATERINO, M. S.; HUNT, T.; VOGLER, A. P. On the constitution and phylogeny of Staphyliniformia (Insecta: Coleoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 34, p. 655-672, 2005.

COIFFAIT, H. *Coleopteres Staphylinidae de la région palearctique occidentale. I. Généralités; Sous-familles: Xantholininae et Leptotyphlinae. Nouvelle Revue d'Entomologie*, Supplément, v. 2, p. ix+651, 1972.

CROWSON, R. A. *The Natural Classification of the families of Coleoptera*. London: Nathaniel Lloyd, 1955.

CROWSON, R. A.; ELLIS, I. Observations on *Dendrophagus crenatus* (Paykull)(Cucujidae) and some comparisons with Piestine Staphylinidae (Coleoptera), p. 161-9, 1968.

EMERY, C. Ueber Phylogenie und Systematik der Insekten. *Biologisches Centralblatt*, v. 5, p. 648-656, 1886.

ERICHSON, W. F. *Genera et species Staphylinorum insectorum coleopterorum familiae*. Berlin: F. H. Morin, p. 1–400, 1839.

FAUVEL, A. Staphylinides nouveaux de l'Inde et de la Malaisie. *Revue d'Entomologie*, v. 14, p. 180–286, 1895.

FERREIRA, V. S. et al. An extraordinary case of elytra loss in Coleoptera (Elateroidea: Lycidae): discovery and placement of the first anelytrous adult male beetle. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 199, n. 2, p. 553–566, 2023.

FLEMING, J. Insecta. In: *Supplement to the fourth, fifth, and sixth editions of the Encyclopedia Britannica, with preliminary dissertations on the history of the sciences*. v. 5. Edinburgh: Archibald Constable and Company, p. 41–56, 1821.

GANGLBAUER, L. *Die Käfer von Mitteleuropa. Die Käfer der österreichisch-ungarischen Monarchie, Deutschlands, der Schweiz, sowie des französischen und italienischen Alpengebietes*. Vol. 2: Familienreihe Staphylinoidea. 1. Teil. *Staphylinidae, Pselaphidae*. Wien: Carl Gerold's Sohn, 1895.

GOCZAŁ, J.; BEUTEL, R. G. Beetle elytra: evolution, modifications and biological functions. *Biology Letters*, v. 19, n. 3, p. 20220559, 2023.

GREBENNIKOV, V. V.; NEWTON, A. F. Good-bye Scydmaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae sensu latissimo (Coleoptera). *European Journal of Entomology*, v. 106, p. 275–301, 2009.

GREBENNIKOV, V. V.; NEWTON, A. F. Detecting the basal dichotomies in the monophylum of carrion and rove beetles (Insecta: Coleoptera: Silphidae and Staphylinidae) with emphasis on the Oxytelinae group of subfamilies. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, v. 70, p. 133–165, 2012.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. New York: Cambridge University Press, p. 772, 2005.

HANSEN, M. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biologiske Skrifter*, v. 48, p. 1–339, 1997.

HERMAN, L. H. Jr. Phylogeny and reclassification of the genera of the rove-beetle subfamily Oxytelinae of the world (Coleoptera, Staphylinidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 142, p. 343–454, 1970.

KASULE, F. K. The subfamilies of the larvae of Staphylinidae (Coleoptera) with keys to the larvae of the British genera of Steninae and Proteininae. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, v. 118, n. 8, p. 261-283, 1966.

KOLBE, H. Mein system der Coleopteren. *Zeitschr. wiss. Insectbiol.*, v. 4, p. 116, 1908.

LATREILLE, P. A. *Histoire naturelle, générale et particulière, des crustacés et des insectes*. v. 3. Paris: F. Dufart, p. 467, 1802.

LAWRENCE, J. F.; NEWTON, A. F. Evolution and classification of beetles. *Annual review of ecology and systematics*, v. 13, p. 261-290, 1982.

LESCHEN, R. A. B; LÖBL, I. Phylogeny of Scaphidiinae with redefinition of tribal and generic limits (Coleoptera: Staphylinidae). 1995.

MAKRANCZY, G. Systematics and phylogenetic relationships of the genera in the Carpelimus group (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae). University of Kansas, 2005.

MCKENNA, D. D. et al. Phylogeny and evolution of Staphyliniformia and Scarabaeiformia: forest litter as a stepping stone for diversification of nonphytophagous beetles. *Systematic Entomology*, v. 40, n. 1, p. 35-60, 2015a.

MCKENNA, D. D. et al. The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. *Systematic Entomology*, v. 40, n. 4, p. 835-880, 2015b.

NAOMI, S. The phylogeny and higher classification of the Staphylinidae and their allied groups (Coleoptera, Staphylinoidea). 1985.

NEWTON, A. StaphBase (version Aug 2022). In: Bánki, O.; Roskov, Y.; Döring, M.; Ower, G.; Hernández Robles, D. R.; Plata Corredor, C. A.; Stjernegaard Jeppesen, T.; Örn, A.; Vandepitte, L.; Hobern, D.; Schalk, P.; Dewalt, R. E.; Ma, K.; Miller, J.; Orrell, T.; Aalbu, R.; Abbott, J.; Adlard, R.; Aedo, C. Et al. *Catalogue of Life (Annual Checklist 2024)*. Catalogue of Life, Amsterdam, Netherlands. <https://doi.org/10.48580/dg9ld-3gk> (accessed 17 mar. 2025).

NEWTON, A. F. et al. 22. Staphylinidae Latreille, 1802. *American beetles*, v. 1, p. 272-418, 2000.

NEWTON, A. F. Redefinition, revised phylogeny, and relationships of Pseudopsinae (Coleoptera, Staphylinidae). *American Museum novitates*; no. 2743. 1982.

NEWTON, A. F.; THAYER, M. K. A critique on Naomi's phylogeny and higher classification of Staphylinidae and allies (Coleoptera). *Entomologia generalis*, v. 14, n. 1, p. 63-72, 1988.

NEWTON, A. F.; THAYER, M. K. Protopselaphinae new subfamily for Protopselaphus new genus from Malaysia, with a phylogenetic analysis and review of the Omaliine Group of Staphylinidae including Pselaphidae (Coleoptera). *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa*, p. 219-320, 1995.

THAYER, M. K. Staphylinidae Latreille, 1802. In: BEUTEL, R. G.; KRISTENSEN, N. P. (eds.). *Handbook of Zoology, Vol. IV, Part 38, Coleoptera, Beetles, Vol. 1: Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim)*, 2nd edn. pp. 394–442. Walter de Gruyter, Berlin, 2016.

THAYER, M. K. Lawrence's six decades of impact on phylogeny and classification of Coleoptera. In: *Annales Zoologici. Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences*, p. 9-31, 2025

WELCH, R. C. Ovariole development in Staphylinidae (Coleoptera). *Invertebrate reproduction & development*, v. 23, n. 2-3, p. 225-234, 1993.

ZHANG, X.; ZHOU, H. How old are the rove beetles (Insecta: Coleoptera: Staphylinidae) and their lineages? Seeking an answer with DNA. *Zoological Science*, v. 30, n. 6, p. 490-501, 2013

ŻYŁA, D.; SOLODOVNIKOV, A. Multilocus phylogeny defines a new classification of Staphylininae (Coleoptera, Staphylinidae), a rove beetle group with high lineage diversity. *Systematic Entomology*, v. 45, n. 1, p. 114-127, 2020.

CAPÍTULO 1

Filogenia molecular multilocus de Piestinae e implicações evolutivas no grupo Oxytelinae (Coleoptera, Staphylinidae)



INTRODUÇÃO

A subfamília Piestinae Erichson, 1839 é considerada cosmopolita e uma das das linhagens mais antigas entre as 35 subfamílias de estafilínídeos atualmente reconhecidas (YAMAMOTO et al. 2018). Compreende um grupo relativamente pequeno, com apenas 115 espécies distribuídas em nove gêneros, sendo seis deles atuais e três extintos (CARON et al., 2025; CARON et al., no prelo) (ver tabela 1). Dos gêneros existentes atualmente, dois estão restritos para a região Neotropical, dois na região Australiana, um somente no leste Paleártico e um gênero Holártico. É interessante a ausência da subfamília na região Afrotropical (SILVA, 2020).

Tabela 1. Visão geral dos gêneros da subfamília Piestinae atualmente reconhecidos no mundo segundo Silva, 2020; Caron et al., 2025 e Caron et al., (no prelo).

Gênero	Nº de espécies (114 spp.)	Distribuição Geográfica
<i>Eupiestus</i> Kraatz, 1859	22	região paleártica oriental
<i>Hypotelus</i> Erichson, 1839	14	regiões Neártica (Flórida) e Neotropical
<i>Parasiagonum</i> Steel, 1950	1	Nova Zelândia
<i>Piestus</i> Gravenhorst, 1806	45	regiões Neártica (Flórida) e Neotropical
<i>Prognathoides</i> Steel, 1950	1	Austrália
<i>Siagonium</i> Kirby & Spence, 1815	28 (†1 sp.)	regiões holártica e neotropical norte (México)
† <i>Eopiestus</i> Cai & Lü, 2017	1	Kaliningrad, Rússia
† <i>Paleosiagonium</i> Yue et al., 2016	2	Chaomidian, China
† <i>Propiestus</i> Yamamoto et al., 2018	1	Kachin, Mianmar

† –gênero/espécie extintos de Piestinae.

Fonte: Autora (2025)

As espécies dessa subfamília habitam principalmente sob a casca de árvores e madeiras em decomposição, ou ocasionalmente em serapilheira (CARON et al. 2012). Embora a biologia detalhada dessas espécies seja pouco conhecida, é aceito que a maioria delas possui hábitos saprófagos, algumas poucas podem ser micófagas (THAYER, 2016); uma hipótese sugerida por Crowson e Ellis (1969), que observaram pequenas invaginações nas mandíbulas, similares às de besouros da

subfamília Scolytinae (Curculionidae) e da superfamília Cucujoidea, que podem servir como micangia para transporte de esporos de fungos.

Originalmente, a subfamília Piestinae foi caracterizada com base em traços plesiomórficos e, no passado, servia como uma categoria para agrupar estafilinídeos cujas características não se alinhavam com outras divisões taxonômicas (CARON et al. 2012). No entanto, avanços mais recentes (CARON et al. 2012; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; BORTOLUZZI et al. 2017, CARON et al., 2025) têm refinado o entendimento sobre Piestinae, tornando-a menos heterogênea. Apesar desses progressos, a monofilia da subfamília ainda é controversa, com Piestinae sendo considerada parte de um clado envolvendo também Osoriinae, mas sem apresentar as apomorfias características da subfamília (THAYER, 2016).

No que diz respeito às mudanças taxonômicas, Bernhauer e Schubert (1910) incluíram cerca de 30 gêneros no que então era considerado a tribo Piestini, dentro de Oxytelinae. Com o tempo, muitos desses gêneros foram realocados para formar grupos próprios ou foram transferidos para subfamílias melhor definidas, como Aleocharinae, Apateticinae, Micropeplinae, Osoriinae, Ploeocharinae e Trigonurinae (ver HERMAN, 2001, para o catálogo completo).

Do ponto de vista filogenético, Thayer (2005) sugeriu que Piestinae, no sentido atual, poderia ser um grupo monofilético e um possível grupo irmão de Osoriinae (ver figura 4). No entanto, análises cladísticas revelaram que a monofilia de toda a subfamília ainda não foi estabelecida (GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; MCKENNA et al., 2015a), indicando que Piestinae pode ser parafilético em relação a Osoriinae e Oxytelinae.

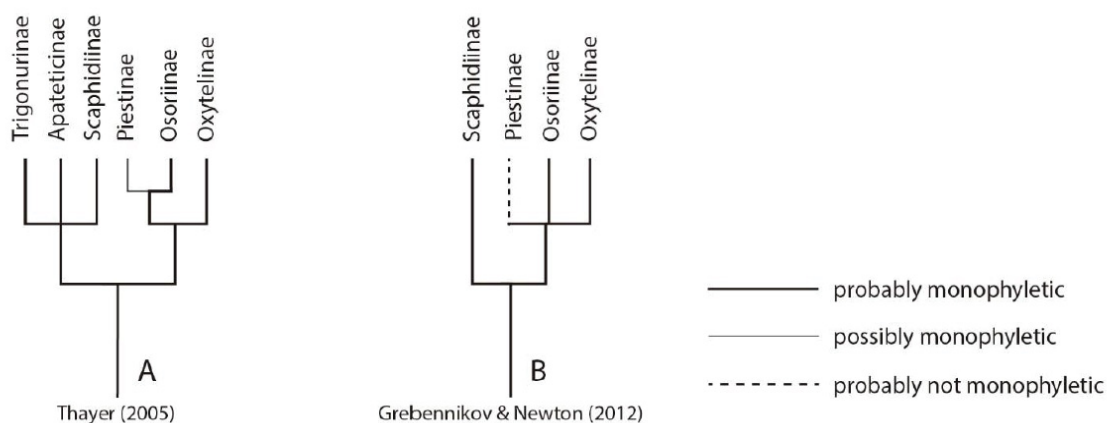


Figura 4. Hipóteses da composição do Grupo Oxytelinae e posição de Piestinae. (A) Após Thayer (2005); (B) Após Grebennikov e Newton (2012). Fonte: Silva (2020).

Os estudos de Grebennikov e Newton (2012), baseados em 240 caracteres morfológicos de larvas e adultos, revelaram que Piestinae está inserida no clado definido pelo grupo Oxytelinae em seu sentido estrito (figura 2). De forma semelhante, McKenna et al. (2015a), utilizando uma abordagem de DNA com dois marcadores moleculares (28S e CAD, totalizando 3430 pb), também sugeriram a parafilia de Piestinae em relação às subfamílias Oxytelinae e Osoriinae (figura 5).

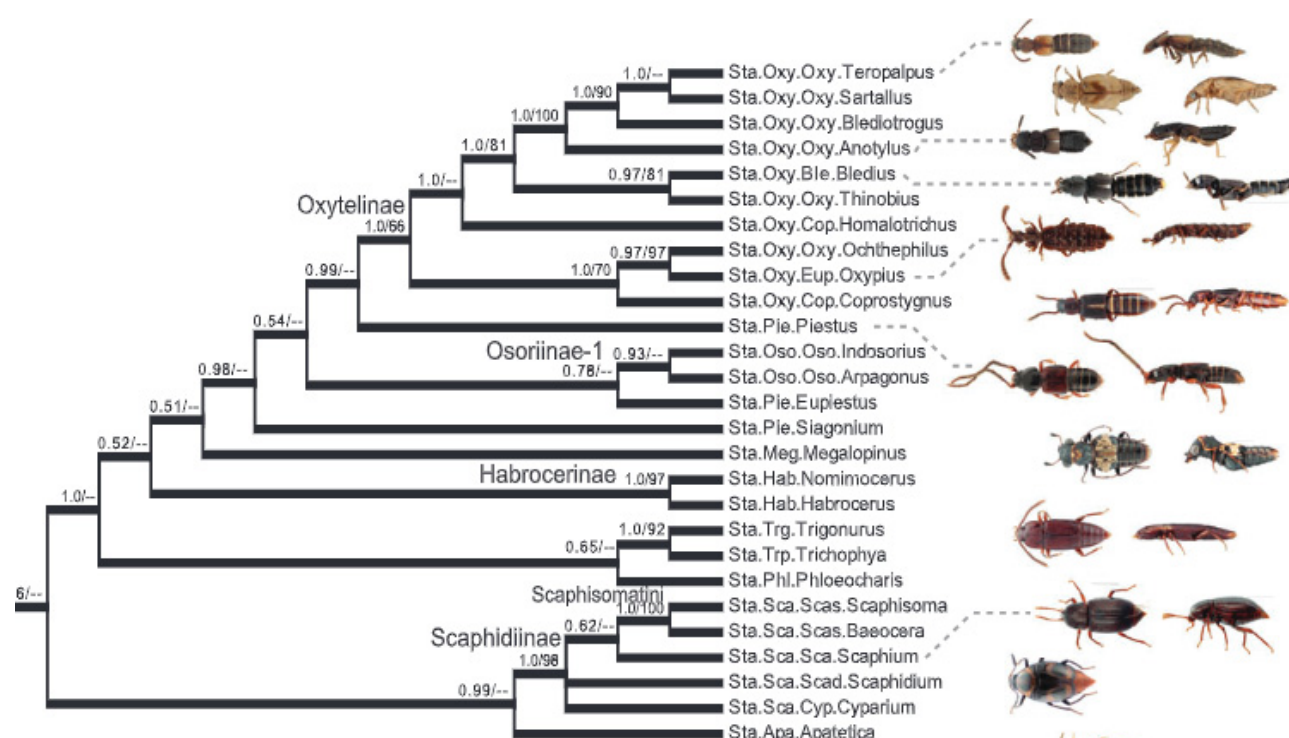


Figura 5. Hipótese de relacionamento filogenético apresentado por McKenna et al. (2015a) para Staphylinidae, resultante de análise de Inferência Bayesiana com base em dois marcadores moleculares (28S e CAD), totalizando 3430 pb.

Análises cladísticas mais focadas dentro de Piestinae foram conduzidas para os gêneros *Piestus*, *Hypotelus* e *Siagonium* (CARON et al., 2012; BORTOLUZZI et al., 2017; YAMAMOTO et al., 2018; CARON et al., 2025; CARON et al., no prelo). Contudo, esses estudos não visaram especificamente testar a monofilia da subfamília. Caron et al. (2012) incluíram como táxons externos representantes dos outros seis gêneros de Piestinae e encontraram suporte para a monofilia de *Piestus*, além de esclarecer as relações entre os gêneros. Já Bortoluzzi et al. (2017)

encontraram evidências de monofilia para *Hypotelus*, que foi identificado como grupo irmão de Osoriinae, embora apenas um táxon terminal de Osoriinae tenha sido utilizado em sua análise.

No estudo de Yamamoto et al. (2018), foi descrito um novo gênero e espécie para Piestinae (*Propiestus archaicus* Yamamoto et al., 2018) com base em um registro fóssil preservado em âmbar birmanês do Cretáceo Superior, encontrado no norte de Mianmar. Os autores propuseram que *Propiestus* é o grupo-irmão de *Piestus*.

Assim como em Caron et al. (2025), os autores descreveram uma nova espécie de *Hypotelus* e, também, reanalisaram a monofilia do gênero por meio de uma análise de evidência total. Seus resultados indicaram que Piestinae é uma subfamília monofilética, embora a amostragem tenha sido limitada (apenas 19 táxons) e o foco do trabalho não tenha sido especificamente testar a monofilia da subfamília.

Por outro lado, o trabalho recente de Caron et al. (no prelo) utilizou caracteres morfológicos de adultos para testar a monofilia de *Siagonium* e investigou sua relação com os demais gêneros de Piestinae. Os resultados indicaram que a monofilia de *Siagonium* pode ser sustentada com a inclusão de *Piestoneus*, levando os autores a sinonimizar *Piestoneus*, integrando suas quatro espécies ao gênero *Siagonium*. Ao final, os autores indicaram *Prognathoides* como grupo-irmão de *Siagonium*.

Uma investigação aprofundada sobre a história evolutiva da subfamília Piestinae é essencial, considerando sua trajetória taxonômica complexa e as incertezas morfológicas destacadas em estudos anteriores (CARON et al. 2008, 2012; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; BORTOLUZZI et al., 2017; YAMAMOTO et al., 2018; CARON et al., 2025; CARON et al., no prelo).

Sabendo que análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA têm se mostrado essenciais para a reconstrução das relações evolutivas entre táxons, permitindo a formulação de hipóteses mais robustas sobre a história e diversificação dos grupos (HILLIS, 1987; WIENS, 2004), e que a maioria dos estudos recentes sobre Piestinae baseiam-se predominantemente em dados morfológicos, acredita-se que uma abordagem utilizando dados moleculares possa contribuir para esclarecer lacunas ainda não resolvidas, especialmente no que diz respeito à monofilia da subfamília e suas relações filogenéticas dentro de Staphylinidae.

Portanto, este capítulo tem como objetivo aprofundar o entendimento sobre Piestinae por meio de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares de cinco genes, utilizando métodos de inferência bayesiana e máxima verossimilhança. A partir dessas análises, busca-se avaliar a monofilia da subfamília e esclarecer suas relações com outros grupos dentro de Staphylinidae, assim como, proporcionar uma base mais sólida para a sistemática de Piestinae, contribuindo para a resolução de questões taxonômicas pendentes e incertas.

OBJETIVOS

- Obter um banco de dados moleculares (fragmentos dos genes COI, Wingless, 28S, ArgK e CAD) de importância filogenética da linhagem Oxytelinae;
- Avaliar a monofilia da subfamília Piestinae por meio da análise de dados moleculares multigênicos utilizando Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e seleção de táxons para análise filogenética

Para a definição do grupo externo, foram selecionados representantes da família Agyrtidae, duas espécies da subfamília Silphinae, bem como representantes de outras subfamílias de Staphylinidae, pertencentes às linhagens Tachyporine e Staphylinine, conforme propostas por Lawrence e Newton (1982): Paederinae, Aleocharinae, Tachyporinae, Steninae, Oxyporinae e Staphylininae (Tabela 2). A escolha desses grupos baseou-se em hipóteses de relacionamento previamente estabelecidas na literatura, em estudos como os de Grebennikov e Newton (2012); Zhang et al., 2018 e Orlov et al., 2021.

A linhagem informal Omaliine não foi incluída neste estudo devido à escassez de sequências moleculares disponíveis no GenBank, a falta de material biológico disponível para a extração de DNA e posterior amplificação dos genes necessários. No entanto, dado que o objetivo principal do nosso trabalho é verificar a monofilia da subfamília Piestinae, a ausência de representantes de Omaliine não interfere de maneira significativa nas nossas análises.

Para testar a monofilia de Piestinae, foram incluídos representantes das demais subfamílias de estafilínídeos pertencentes à linhagem informal Oxytelinae, segundo Grebennikov e Newton (2012), como Scaphidiinae (somando seis espécies e quatro gêneros), Oxytelinae (somando sete espécies e quatro gêneros) e Osoriinae (somando dez espécies e nove gêneros).

Para o grupo interno, foram selecionados representantes de quatro dos seis gêneros existentes de Piestinae. Os gêneros *Parasiagonium* e *Prognathoides* não foram analisados devido falta de exemplares para extração de DNA e sequências disponíveis no GenBank (tabela 2).

Parte do material utilizado foi fornecido por instituições como CESP/UFPR - Coleção Entomológica do Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná; DZUP - Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Curitiba, Paraná; e FMNH – Museu de História Natural de Chicago, Estados Unidos. Outra parte do material foi obtida por meio de coletas nos municípios de Palotina - PR (Mata adjacente a UFPR) e Céu Azul - PR (Parque Nacional do Iguaçu) entre os anos de 2017 e 2023.

Os exemplares utilizados para as extrações de DNA estão listados a seguir, com informações referentes à identificação e dados de procedência da coleta: *Aleochara signaticollis*, etiqueta: “BR - PR - Matinhos Bal. Mirassol 06-XII-2018 A. Isaac, col / Aleochara Coprochara / *Aleochara* (C.) *signaticollis* det. E. Caron, 2019”; *Aleochara lustrica*, etiqueta: “Brasil, Paraná, Palotina UFPR Mata anexa 29-X-2014 D. Moura, col. / Coletado em carne em decomposição/ *Aleochara* sp.”; *Ctenopeuca romani*, etiqueta: “BRA-BA-Rio das Contas 21-XI-2010”; *Paederus protensus*, etiqueta: “Gurupi - TO 01-V-2015 Nogueira K4/ *Paederus protensus*”; *Paederus protensus*, etiqueta: “Brasil, Paraíba, Matureia Pico do Jabre, II-VII.2018 7°15'12"S, 37°23'9W 1100m Ferreira - Jr, A. 1 Macho montado / *Paederus protensus* Sharp, 1876 det. E. Caron, 2018”; *Philonthus* sp., etiqueta: “Brasil, Paraná, Tibagi, Pq. Estadual do Guartela 24°33'49.25"S - 50° 15'34.97"W, FIT 12-XII-2011 M. Caetano & A. Tishechkin (leg.)”; *Bledius fernandezi*, etiqueta: “Brasil, PR, Pontal do Paraná, ATAMY 05-IV-2017 E. Caron, col / *Bledius fernandezi* det. E. Caron, 2017”; *Bledius hermani*, etiqueta: “Brasil, PR, Pontal do Paraná - Cormery 05-IV-2017 E. Caron, col. / *Bledius hermani* det E. Caron, 2017”; *Bledius bonariensis*, etiqueta: “Brasil, PR, Pontal do Paraná Centro de Estudos do Mar (CEM - UFPR) 05-IV-2017 E. Caron, col. / *Bledius bonariensis* det. E. Caron, 2017”; *Bledius bonariensis*, etiqueta: “BRASIL: Paraná, Matinhos , vii.2017 E. Caron”; *Osorius* sp., etiqueta: “BR, PR, Céu

Azul, Parque Nacional do Iguaçu 25° 09' 15"S - 53° 50' 45"W ; 11-XI-2017 ; Caron, Leivas, Bortoluzzi & Busanello col.”; *Eleusis* sp., etiqueta: “BR, PR, Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu 25° 09' 15"S - 53° 50' 45"W ; 11-XI-2017 ; Caron, Leivas, Bortoluzzi & Busanello col.”; *Leptochirus* sp., etiqueta: “BR, PR, Céu Azul Pq. Nacional do Iguaçu XI-2017 E. Caron, col/ *Leptochirus* sp. Osoriinae”; *Lispinus* sp., etiqueta: “BR, PR, Céu Azul Parque Nacional do Iguaçu 25°09'15"S - 53°50'45"W 11-XI-2017 Caron, Leivas, Bortoluzzi & Bussanelo col./ *Lispinus* ou *Nacaeus*?/ *Lispinus* sp. Erichson, 1839 det. E. Caron, 2018”; *Thoracophorus* sp., etiqueta: “BR, PR, Céu Azul, Parque Nacional do Iguaçu 25° 09' 15"S - 53° 50' 45"W ; 11-XI-2017 ; Caron, Leivas, Bortoluzzi & Busanello col.”; *Cyparium* sp.1, etiqueta: “BR, PR, Céu Azul Parque Nacional do Iguaçu 25°09'15"S - 53°50'45"W 11-XI-2017 Caron, Leivas, Bortoluzzi & Bussanelo col. / Scaphidiinae larval? / Scaphidiinae adultos”; *Cyparium* sp.2, etiqueta: “BR, PR, Céu Azul Parque Nacional do Iguaçu 25°09'15"S - 53°50'45"W 11-XI-2012 Caron, Leivas, Bortoluzzi & Bussanelo, col. / Scaphidiinae”; *Piestus buquetii*, etiqueta: “BR, PR, Céu Azul Parque Nacional do Iguaçu 25°09'15"S - 53°50'45"W 11-XI-2017 Caron, Leivas, Bortoluzzi & Bussanelo col. / *Piestus buquetii* Fauvel, 1864 Det. E. Caron, 2018”; *Piestus minutus*, etiqueta: “Brasil, PR, Palotina, UFPR Mata anexa 30-III-2017 FIT - Borda C2 L. Margato & S. Zanella, col.”; *Piestus sulcatus*, etiqueta: “Brasil: Acre, Rio Branco, 10°01'49.8S:67°41'00.5W, Pitfall com fezes, 15-VII-2016, W.P. Sutil & F.A. Oliveira (leg) / *Piestus sucatus* det. E. Caron”; *Hypotelus pusillus*, etiqueta: “BR - Pr- Céu Azul Pq. Nac. do Iguaçu XI-2017 E. Caron, col / *Hypotelus* sp. Piestinae/ *Hypotelus pusillus*”; *Hypotellus* sp., etiqueta: “BRASIL: Cornélio Procópio Pq Estadual Mata São Francisco Cipola N.G, col. 2009”; *Hypotelus chusqueaticus*, etiqueta: “Ecuador, Napo, Cosanga/2117m, 8.VII.2018\Jim McClarin, col./Collected from the sub-stipule\space of Chusquea scandens bamboo/*Hypotelus chusqueaticus* McClarin and Caron\desig. Caron, 2024”.

Um total de 54 sequências nucleotídicas, correspondentes a cinco genes foram obtidas em laboratório, abrangendo 21 exemplares (36%). Adicionalmente, 101 sequências provenientes do GenBank, representando 37 táxons analisados (63%), foram acessadas e utilizadas.

Tabela 2. Táxons amostrados para os dados moleculares. Números de acesso são indicados para as sequências obtidas no GenBank; “Inédita” indica sequências obtidas neste trabalho. “—” indica os dados faltantes.

Família	Grupo	Subfamília	Espécie	COI	Wingless	28S	CAD	ArgK
grupo externo (49 espécies)								
Agyrtidae	sem grupo	Agyrtinae	<i>Ipelates latus</i>	MF642043.1	KP813451.1	KP419489.1	KJ845238.1	KP812292.1
Agyrtidae	sem grupo	Pterolomatinae	<i>Apteroloma tenuicorne</i>	-	KP813340.1	KJ844914.1	KJ845187.1	KP812181.1
Silphinae	sem grupo	-	<i>Nicrophorus tomentosus</i>	KR486235.1	KP813496	KP419542	EU147405.1	KP812337
Silphinae	sem grupo	-	<i>Necrophila americana</i>	KR125431.1	KP813493.1	KP419537.1	KJ845197.1	KP812334.1
Staphylinidae	Tachyporine	Tachyporinae	<i>Tachinus</i> sp.	JX878849.1	JX878796.1	JX878743.1	-	-
Staphylinidae	Tachyporine	Tachyporinae	<i>Coproporus</i> sp.	JX878850.1	JX878797.1	JX878744.1	-	-
Staphylinidae	Tachyporine	Aleocharinae	<i>Aleochara signaticollis</i>	Inédita	-	Inédita	-	Inédita
Staphylinidae	Tachyporine	Aleocharinae	<i>Aleochara lustrica</i>	Inédita	Inédita	Inédita	-	-
Staphylinidae	Tachyporine	Aleocharinae	<i>Ctenopeuca romani</i>	-	-	Inédita	-	-
Staphylinidae	Tachyporine	Aleocharinae	<i>Hoplandria lateralis</i>	-	-	KC132541.1	-	-
Staphylinidae	Staphylinine	Steninae	<i>Stenus formicatus</i>	DQ155777.1	-	EF213829.1	-	-
Staphylinidae	Staphylinine	Steninae	<i>Stenus</i> sp.	JX878820.1	JX878767.1	JX878714.1	-	-
Staphylinidae	Staphylinine	Steninae	<i>Stenus</i> sp. 2	MN264596.1	-	-	MN256444.1	MN251779.1
Staphylinidae	Staphylinine	Steninae	<i>Dianous</i> sp.	JX878819.1	JX878766.1	JX878713.1	-	-
Staphylinidae	Staphylinine	Oxyporinae	<i>Oxyporus</i> sp.	JX878817.1	JX878764.1	JX878711.1	-	-

Staphylinidae	Staphylinine	Oxyporinae	<i>Oxyporus femoralis</i>	KT021973.2	KT022070.1	-	KT000243.2	KT021925.2
Staphylinidae	Staphylinine	Paederinae	<i>Astenus</i> sp.	GU377362	GU377463	GU377318	KF178775	KF178775
Staphylinidae	Staphylinine	Paederinae	<i>Hyperomma</i> sp.	KR259767	KR259704	-	KR259669	KR259669
Staphylinidae	Staphylinine	Paederinae	<i>Paederus</i> sp.	GU377386	GU377488	GU377340	KF178776	-
Staphylinidae	Staphylinine	Paederinae	<i>Paederus protensus</i>	Inédita	Inédita	-	-	-
Staphylinidae	Staphylinine	Staphylininae	<i>Afroquedius sexpunctatus</i>	KT021972	KT022060	KR559843	KT000237	KT021919
Staphylinidae	Staphylinine	Staphylininae	<i>Quedionuchus plagiatus</i>	KT021945	KT022036	KR559840	-	KT021906
Staphylinidae	Staphylinine	Staphylininae	<i>Bolitogyrus bullatus</i>	KT021959	KT022052	KR559833	-	KT021888
Staphylinidae	Staphylinine	Staphylininae	<i>Philothalpus falini</i>	KF178718.1	KF178734.1	KF178763.1	KF178821.1	KF178789.1
Staphylinidae	Staphylinine	Staphylininae	<i>Philonthus</i> sp.	Inédita	Inédita	-	-	Inédita
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Bledius tricornis</i>	JX878828.1	JX878775.1	JX878722.1	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Bledius fernandezi</i>	Inédita	Inédita	Inédita	-	Inédita
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Bledius hermani</i>	-	Inédita	-	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Bledius bonariensis</i>	-	-	Inédita	-	Inédita
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Oxytelus incisus</i>	JX878833.1	JX878780.1	JX878727.1	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Deleaster bactrianus</i>	JX878830.1	JX878777.1	JX878724.1	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Oxytelinae	<i>Sartallus signatus</i>	-	-	KJ845027.1	KJ845219.1	-
Staphylinidae	Oxyteline	Osoriinae	<i>Renardia nigrella</i>	-	-	KJ845085.1	KJ845202.1	KP812396.1
Staphylinidae	Oxyteline	Osoriinae	<i>Eleusis mutica</i>	-	-	KJ845091.1	KJ845230.1	-

Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Eleusis</i> sp.	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Neolispinus</i> sp.	-	-	KJ844994.1	KJ845177.1	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Leptochirus</i> sp.	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Plastus miles</i>	-	-	KJ844887.1	KJ845231.1	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Thoracochirus</i> sp.	-	-	KJ844913.1	KJ845317.1	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Lispinus</i> sp.	Inédita	Inédita	-	Inédita	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Nacaeus longulus</i>	JX878837.1	JX878784.1	JX878731.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Osoiriinae	<i>Thoracophorus</i> sp.	Inédita	Inédita	-	Inédita	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Cyparium concolor</i>	-	-	KJ845083.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Cyparium</i> sp.	Inédita	-	-	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Cyparium</i> sp2	Inédita	-	Inédita	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Scaphidium quadrimaculatum</i>	DQ221985.1	-	DQ202643.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Baeocera</i> sp.	JX878843.1	JX878790.1	JX878737.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Scaphidiinae	<i>Scaphisoma</i> sp.	-	-	KJ845040.1	KJ845236.1	-
grupo interno (9 especies)								
Staphylinidae	Oxytelinae	Piestinae	<i>Siagonium americanum</i>	-	-	KJ844988.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Piestinae	<i>Eupiestus</i> sp.	-	-	KJ845030.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Piestinae	<i>Piestus extimus</i>	-	-	KJ844987.1	-	-
Staphylinidae	Oxytelinae	Piestinae	<i>Piestus buquetii</i>	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita	Inédita

Staphylinidae	Oxyteline	Piestinae	<i>Piestus minutus</i>	Inédita	-	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Piestinae	<i>Piestus sulcatus</i>	Inédita	-	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Piestinae	<i>Hypotelus pusillus</i>	Inédita	-	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Piestinae	<i>Hypotelus</i> sp.	Inédita	Inédita	-	-
Staphylinidae	Oxyteline	Piestinae	<i>Hypotelus chusqueaticus</i>	-	Inédita	-	-

Marcadores moleculares

Para a escolha dos genes de interesse foi realizado um levantamento bibliográfico dos principais trabalhos de filogenia molecular para Staphyliniformia entre os anos de 2000 e 2020. Com base nos dados levantados, foi selecionado um conjunto de cinco marcadores moleculares: rDNA mitocondrial subunidade I da citocromo c oxidase (COI), 28S rDNA (28S), Wingless (Wg), arginina quinase (ArgK) e carbamoil-fosfato sintase (CAD) (ver tabela 3 para desenho dos iniciadores).

Para detecção de padrões filogenéticos mais rasos foi selecionado o gene citocromo c oxidase subunidades I (COI), o qual está entre os genes mais utilizados em trabalhos para sequências de DNA, e têm relatado sucesso na detecção de padrões filogenéticos (CATERINO et al. 2000). Assim como, o gene CAD, que apresenta um desempenho mais confiável para divergências mais rasas do que mais profundas, e que segundo Wild e Maddison (2008) é o fragmento de gene de melhor resultado, aparentemente devido seu forte desempenho entre divergências recentes e dos altos valores de suporte entre os clados. Portanto, foram selecionados para fornecerem resoluções em níveis taxonômicos mais baixos, como espécie e gênero (MAUS et al., 2001).

Quanto às análises de divergências filogenéticas mais profundas, selecionamos os genes 28S, Wg, e ArgK, os quais são considerados fáceis de serem amplificados em Staphilinidae, e por isso também são muito utilizados em trabalhos filogenéticos (CHATZIMANOLIS et al., 2010), assim como, demonstram bom desempenho filogenético em níveis taxonômico mais inclusivos tais quais tribo, subfamília e família (WILD; MADDISON, 2008; MADDISON et al., 2009; MILLER et al., 2009). Portanto, com este conjunto de genes, pretende-se obter resolução filogenética em um amplo gradiente de divergências, desde o nível de família ao nível de gênero.

Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais envolvendo a extração, amplificação e sequenciamento do DNA foram realizados em parceria com o Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ/PR, no Laboratório de Biologia Molecular e Sistêmica de Tripanossomatídeos (LABTRYP).

O DNA genômico total foi extraído segundo Caron et al., 2025, no qual

consiste de método de extração desenvolvido diante da necessidade de obter DNA de alta qualidade com baixo custo (método em processo de publicação). O protocolo de extração de DNA genômico em questão, foi adaptado do manual do equipamento Bullet Blender® (Storm 24, modelo BBY24M, Next Advance, Inc., NY , EUA) e informações obtidas na literatura através de outras metodologias de extração de DNA de insetos (DILLON et al., 1996; WANG; WANG, 2012; TIAN; YU, 2013; ASGHAR et al., 2015).

O protocolo é baseado em lise mecânica com microesferas de aço inoxidável utilizando o equipamento Bullet Blender® e seguida de purificação pelo método de lise alcalina modificada. Esta metodologia utiliza apenas 5 reagentes, comuns, atóxicos e de fácil acesso em laboratórios (proteinase K, dodecilsulfato de sódio - SDS, cloridrato de guanidina, acetato de sódio e etanol), o processo de extração leva aproximadamente 4 horas no total, 3 horas de incubação e 1 hora com quatro processos de centrifugação para precipitação de proteínas e lavagem de DNA.

Uma das novidades do protocolo é a utilização do equipamento Bullet Blender® para a lise mecânica das células. O processo ocorre com o auxílio de esferas metálicas de aço inoxidável (3,5–0,9mm) que, ao serem processadas no equipamento, geram atrito para quebrar os tecidos do corpo em partes menores, expondo-os para extração química. Apenas a cabeça e o tórax foram utilizados na extração para evitar a contaminação do genoma pelos microrganismos presentes no trato digestivo (OLIVEIRA et al. 2017).

As suspensões de DNA obtidas foram quantificadas usando NanoDrop (espectrofotômetro NanoDrop OneC Microvolume UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Após a quantificação, foi gerada uma alíquota para cada amostra na concentração final de 10 ng/μL para amplificação por PCR e armazenada a 4 °C. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através da amplificação por PCR de cinco genes alvo, a saber: Wingless, COI, 28S, CAD e ArgK.

A reação de amplificação por PCR foi otimizada avaliando diferentes volumes de reação e concentrações de componentes até atingir o melhor rendimento do produto de PCR, resultando na seguinte receita de reação: 7 μL de água ultrapura, 2 μL de cloreto de sódio 500 mM, 7 μL de solução PCR (Master Mix - TECPAR), 1 μL de *primer forward* (10 pMol/μL), 1 μL de *primer reverse* (10 pmol/μL) e 2 μL do DNA extraído em concentração de 10 ng/μL.

Tabela 3. Marcadores moleculares utilizados neste estudo com respectivos protocolos de PCR.

Gene	Código dos Primers	Sequência (5' → 3')	Pares de base	Desnaturação (°C - Tempo)	Anelamento (°C - Tempo)	Extensão (°C - Tempo)	Referência
COI	C1-J-2183	CAACATTATTTTGAATTTTGG	~550	94° - 45s	45° - 30s	72° - 60s	Simon et al., (1994)
	L2-N-3014	TCCAATGCAC TAATCTGCCATATTA					
28S	fw1	AGCGGAGGAAAAGAAACTA	~850	95° - 30s	56° - 60s	72° - 60s	Sonnenberg et al. (2007)
	rev1	TACTAGAAAGGTCGATTAGTC					
Wingless	Wg578F	TGCACNGTGAARACYTGCTGGATG	~380	94° - 30s	59° - 30s	72° - 180s	Ward; Downie, (2005) Abouheif and Wray (2002)
	WgABR	ACYTCGCAGCACCARTGGAA					
Argk	AK183F	GATTCTGGAGTCGGNATYTAGCNCCYGAYGC	~560	94° - 30s	55° - 30s	72° - 60s	Wild; Maddison, (2008)
	AK939R	GCCNCCYTCRGCTCRGTGTGYTC					
CAD	CD439F	TTCAGTGACARTTYCAYCCHGARCAAYAC	~660	94° - 45s	55° - 45	72° - 180s	Wild; Maddison, (2008)
	CD688R	TGTATACCTAGAGGATCDACRTTYTCCATRTTRCA					

35-40x

Tempo de extensão final: 2-10 minutos

Uma quantificação espectrofotométrica foi adotada para medir a concentração do DNA extraído (em ng/ μ L) e do produto de PCR utilizando o equipamento NanoDrop One seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de amplificação por PCR foram confirmados em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com tampão TBE (0,5 X) em corrente de 60V por aproximadamente 120 min. O DNA foi colocado em corante intercalante de brometo de etídio (10 mg/mL) por 10 minutos e visualizado em sistema de documentação fotográfica com luz UV (L-Pix Ex, Locus. São Paulo, Brasil).

As purificações foram feitas utilizando kit comercial “Thermo Scientific® GeneJet Gel Extraction Kit”. O sequenciamento foi realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ), por meio do método sanger, e todas as sequências foram geradas em ambas as direções e confirmadas com fitas *sense* e *anti-sense*.

Alinhamento e análises filogenéticas

Tanto o alinhamento como as análises filogenéticas seguem Caron et al., 2025, no qual são discriminadas a seguir. Assim, as sequências geradas foram editadas, conferidas e compiladas usando o programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2021) utilizando para auxílio a visualização do cromatograma. O consenso dos alinhamentos das sequências *forward* e *reverse* foram obtidos mediante o padrão de alinhamento do MUSCLE®, inserido dentro do programa MEGA 11. Os consensos foram exportados no formato fasta e comparados via *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para ratificação da identificação e concordância com sequências publicadas de grupos taxonômicos próximos.

O alinhamento dos cinco genes foi feito por meio do MAFFT versão 7 (KATO; STANDLEY, 2013), com configuração AUTO para os genes COI, Wingless, CAD e Argk, e configuração avançada E-INS-i para o 28S, recomendado para sequências com múltiplos domínios conservados e lacunas longas. Ao fim, as sequências foram refinadas manualmente no MEGA 11, quando estritamente necessário, mediante comparação com o cromatograma.

O esquema de particionamento de melhor ajuste e os modelos de substituição apropriados para as posições de códons de cada gene foram determinados no Software PhyloSuite (ZHANG et al., 2020) com o plug-in modelfinder, usando o critério de informação de Akaike (AIC).

A análise de máxima verossimilhança (ML) foi executada usando o plug-in IQTREE no PhyloSuite. Para análise de suporte, utilizamos bootstrap ultrarrápido executando 1.000 réplicas. A análise de inferência bayesiana também foi realizada no programa PhyloSuite, por meio do plug-in MrBayes, com configuração para 5.000.000 de gerações. As árvores filogenéticas finais para ambos os testes foram observada anteriormente no FigTree v1.4.4 e editadas no software Inkscape 1.0.1.

Para avaliar o suporte dos nós nas árvores filogenéticas, foram utilizadas métricas específicas para cada método de inferência. Na análise de Máxima Verossimilhança (ML), o suporte dos clados foi aferido por meio de valores de Bootstrap ultrarrápido (BS), que representam a confiança em cada nó com base na frequência de sua recuperação em réplicas de reamostragem dos dados (HOANG et al., 2018). Na inferência bayesiana, o suporte dos clados foi quantificado pela Probabilidade Posterior (PP), que expressa a probabilidade de cada clado ser verdadeiro, considerando o modelo e os dados analisados (HUELSENBECK et al. 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

Em nossas análises, os nós com probabilidade posterior (PP) $\geq 0,95$ ou valores de bootstrap sob máxima verossimilhança (BS) $> 80\%$ foram considerados fortemente suportados; aqueles com PP entre 0,90 e 0,94 ou BS entre 70% e 80% foram classificados como moderadamente suportados; e nós com PP entre 0,85 e 0,89 ou BS entre 50% e 69% foram considerados fracamente suportados. Nós com PP $< 0,85$ ou BS $< 50\%$ foram interpretados como sem suporte, conforme os critérios de Żyła e Solodovnikov (2020).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O conjunto de dados moleculares concatenados compreendeu um total de 5.735 pares de bases alinhados, distribuídos entre os seguintes genes: COI (859 pb), Wg (500 pb), 28S (1.756 pb), CAD (1.885 pb) e Argk (738 pb). A ausência de dados foi mais significativa nos genes *Argk* (66% de ausência) e *CAD* (57% de ausência), devido à indisponibilidade de sequências para muitas das espécies-alvo no GenBank, bem como a dificuldades de amplificação, mesmo após diversas modificações nos protocolos.

O esquema de partição e respectivos modelos evolutivos indicados com base no critério de melhor ajuste foram: 28S (1-1756pb – GTR+F+I+G4), Argk (1757-2494

– GTR+F+I+G4); CAD (2495-4379 – GTR+F+G4); COI (4380-5238 – GTR+F+G4) e WG (5239-5735 – GTR+F+I+G4). Para os dados concatenados, o modelo GTR+I+G4 foi o mais adequado em ambas as análises, assegurando um bom ajuste ao conjunto de dados.

Entre nossos resultados, encontramos Piestinae como uma subfamília parafilética em ambas as análises (máxima verossimilhança e inferência bayesiana, figuras 6 e 7, respectivamente). Apesar dos gêneros *Piestus* e *Hypotelus* formarem um clado bem suportado (BS: 100; PP: 100), temos os gêneros *Eupiestus* e *Siagonium* sendo recuperados como mais proximamente relacionados aos Oxytelinae.

Na análise de inferência bayesiana realizada, observamos a presença de politomias (figura 7), ou seja, múltiplas ramificações em um único nó da árvore filogenética, nas relações internas do gênero *Piestus*. A ocorrência de politomia sugere que a resolução de relações evolutivas entre os grupos analisados não é clara, refletindo uma incerteza na estrutura filogenética proposta. Isso pode resultar de dados limitados, processos evolutivos complexos ou divergências rápidas entre as linhagens (SAYYARI; MIRARAB, 2018).

A linhagem Oxytelinae foi recuperada como monofilética nas análises de inferência bayesiana e máxima verossimilhança, composta por dois cladogramas principais. O clado A inclui as subfamílias Oxytelinae, "Piestinae" e Osoriinae, com 'Piestinae' sendo recuperada como parafilética. Em ambas as análises, Osoriinae foi recuperada como grupo irmão de Oxytelinae + "Piestinae".

Tanto na análise de máxima verossimilhança quanto na inferência bayesiana, os gêneros neotropicais de Piestinae (*Hypotelus* e *Piestus*) formaram um clado, posicionado como grupo irmão de Oxytelinae + os gêneros paleárticos de Piestinae (*Eupiestus* e *Siagonium*). Osoriinae se mostra uma subfamília monofilética com suporte máximo em ambas as análises e, mesmo com um suporte baixo, é posicionada como grupo irmão de Oxytelinae + "Piestinae" (figuras 6 e 7).

O clado B é composto pela subfamília Scaphidiinae, que foi recuperada como monofilética, apresentando um suporte superior na análise de inferência bayesiana (BS = 76; PP = 97) e grupo irmão do clado A (figuras 6 e 7).

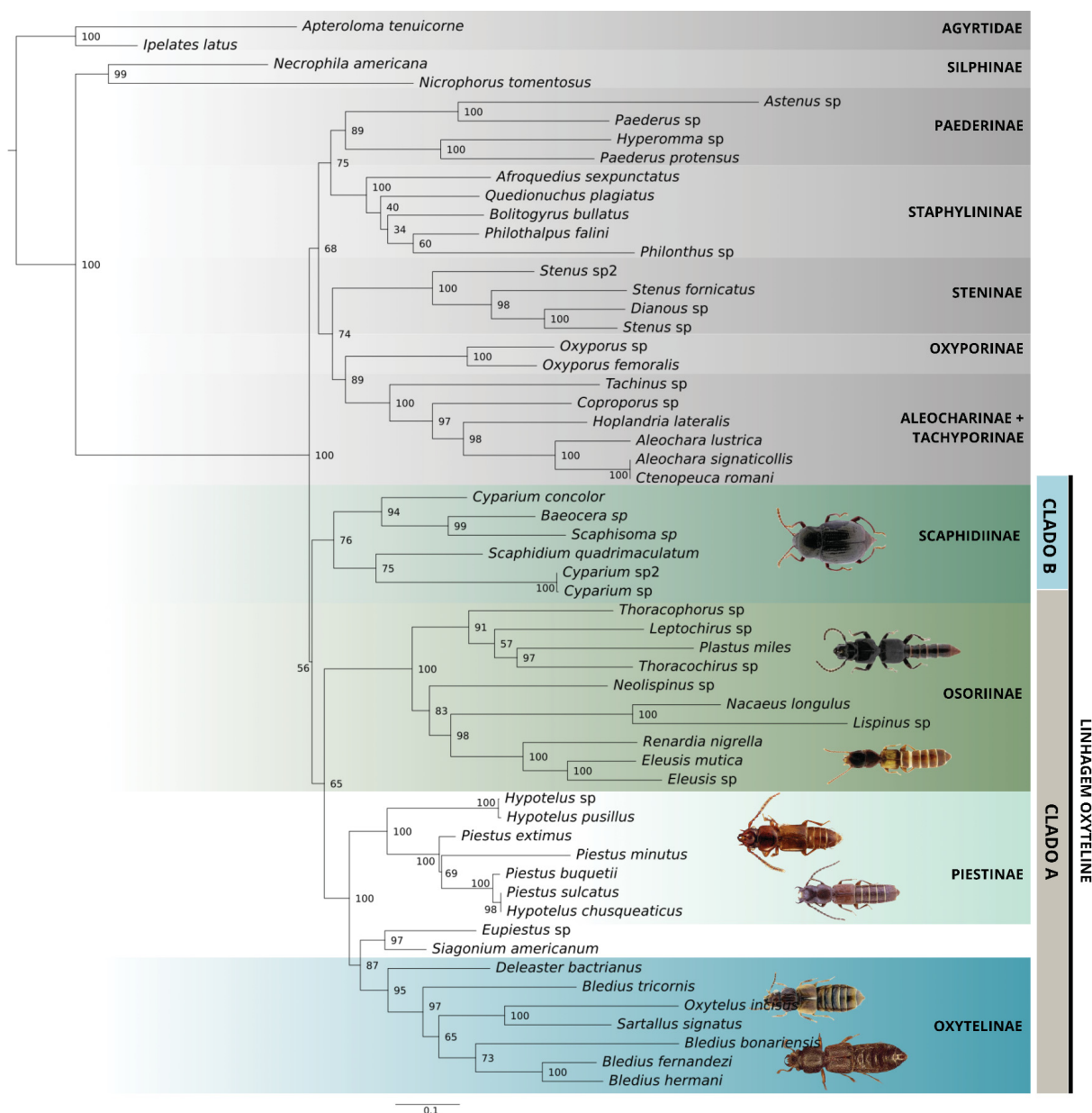


Figura 6. Filograma de Maxima Verossimilhança das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG da linhagem Oxytelinae. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.

As demais linhagens incluídas neste estudo, como Staphylinine e Tachyporine, não foram bem resolvidas, em ambas as análises. No entanto, encontramos as subfamílias como grupos monofiléticos bem suportados, com exceção de “Tachyporinae”, que se mostrou parafilética em relação a Aleocharinae.

A subfamília Staphylininae foi recuperada como grupo irmão de Paederinae (BS = 75; PP = 98). Além disso, Steninae também se apresentou como um grupo

monofilético com valor de suporte máximo, situado na base do clado: Steninae + (Oxyporinae + (“Tachyporinae” + Aleocharinae)).

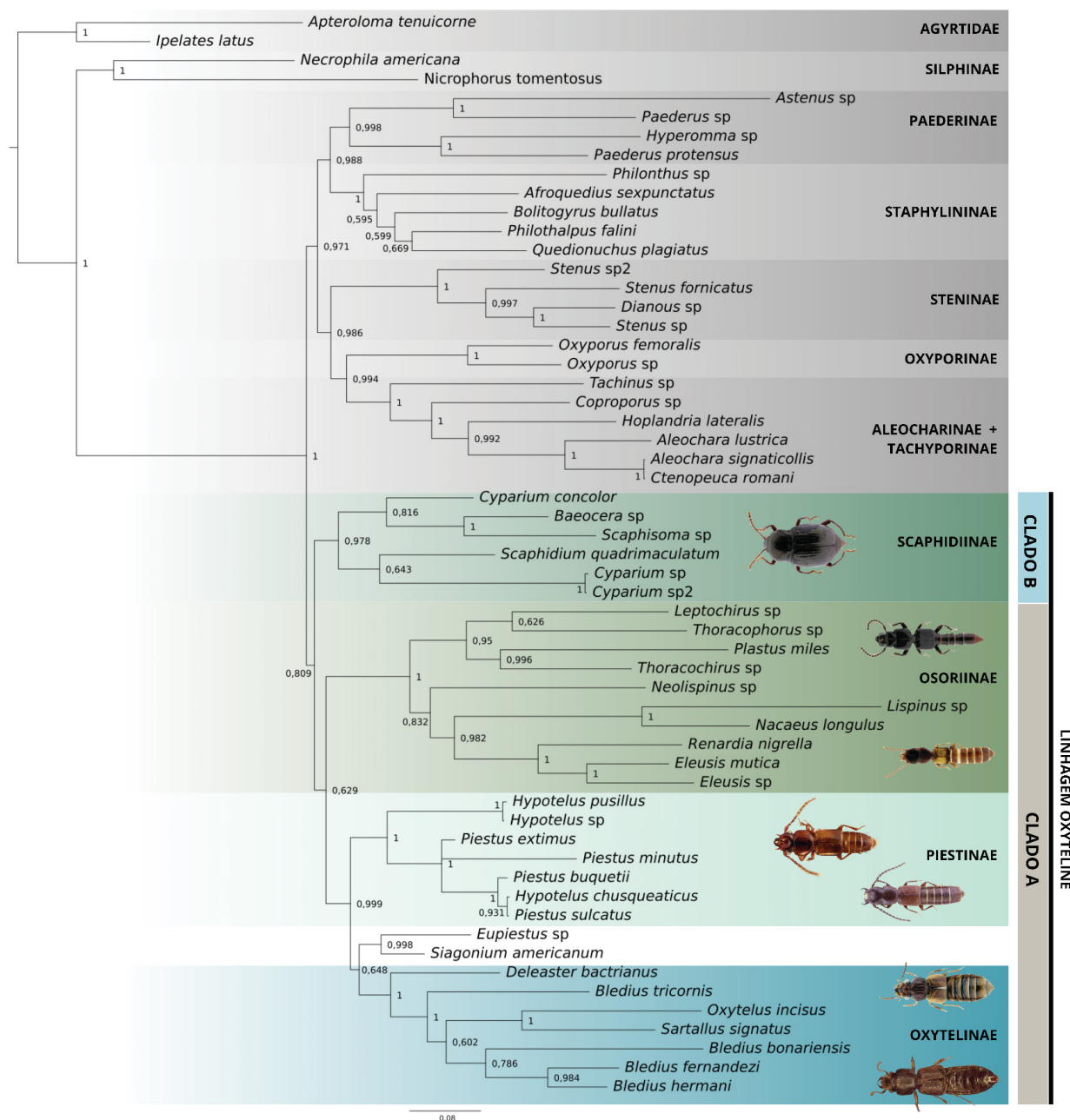


Figura 7. Filograma de maioria da análise de inferência bayesiana das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG da linhagem Oxytelinae pós-burnin de 25%. Valores de probabilidade posterior são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.

As análises filogenéticas realizadas, com base nos métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, confirmaram a monofilia da subfamília Silphinae, que se mantém como um clado independente e bem suportado (BS = 99;

PP = 100), permanecendo como grupo irmão de todas as demais subfamílias de Staphylinidae testadas neste trabalho.

Piestinae é monofilético?

Nossas análises indicaram que Piestinae não é um grupo monofilético, em concordância com reconstruções filogenéticas anteriores (GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; MCKENNA et al., 2015 a, b). No entanto, diferentemente desses estudos, nossos resultados apontam para a parafilia de Piestinae, no qual resultou em dois clados de distintas regiões biogeográficas, um formado pelos gêneros neotropicais (*Hypotelus* e *Piestus*, através de ML e IB) e outro composto pelos generos paleárticos (*Siagonium* e *Eupiestus*, através de ML e IB).

Nas análises filogenéticas baseadas em dados morfológicos apresentadas por Grebennikov e Newton (2012), Piestinae foi recuperado como polifilético, com *Eupiestus* e *Siagonium* apresentando origens independentes. No entanto, ambos foram posicionados na base do clado que agrupa Oxytelinae, Osoriinae e os demais Piestinae. Referente ao restante dos Piestinae, os autores encontraram ainda o clado (*Piestus* + *Prognathoides*) como grupo-irmão de (*Hypotelus* + Osoriinae).

Comparando os resultados deste estudo com os de Grebennikov e Newton (2012), destacam-se diferenças importantes nas relações filogenéticas entre determinados gêneros. Enquanto em Grebennikov e Newton (2012) *Eupiestus* e *Siagonium* foram indicados como tendo origens independentes, nossos resultados os recuperam como compartilhando uma mesma origem (BS = 97; PP = 99). Da mesma forma, *Piestus* e *Hypotelus*, que também foram tratados como tendo origens independentes no estudo de 2012, aparecem em nosso trabalho como pertencentes a uma linhagem em comum em ambas as análises, com valor de suporte máximo (BS = 100; PP = 100).

No trabalho de McKenna et al. (2015a) foram realizadas análises de inferência bayesiana e máxima verossimilhança, utilizando dados moleculares de dois genes nucleares (28S e CAD). Os autores demonstraram que Piestinae é polifilético e parafilético, respectivamente, em relação às subfamílias Oxytelinae e Osoriinae combinadas. Nesse estudo, das 35 subfamílias de Staphylinidae analisadas, 31 foram incluídas no estudo, e a monofilia foi recuperada para somente 12 delas.

Os autores encontraram o gênero *Siagonium* posicionado na base do clado formado por (*Eupiestus* + Osoriinae, parte 1) + (*Piestus* + Oxytelinae) em análise por inferência bayesiana, tendo a subfamília Piestinae polifilética. No entanto, assim como em nossas análises, os autores recuperaram Piestinae como um clado parafilético na análise de máxima verossimilhança, com *Eupiestus* + *Siagonium* posicionados na base do clado (*Piestus* + Oxytelinae). É importante destacar que, em nossas análises, utilizamos as sequências do gene 28S de *Siagonium* sp., *Eupiestus* sp. e *Piestus extimus*, previamente amplificadas e sequenciadas no estudo de McKenna et al., (2015a).

Silva (2020), realizou um estudo para reavaliar a monofilia da subfamília Piestinae sob diferentes fontes de dados. As análises foram baseadas em 164 caracteres morfológicos de adultos, 74 caracteres morfológicos de larvas e dados de sequência de DNA de três regiões gênicas (28S: 1636pb, CO1: 844pb e Wg: 451pb). Os dados foram analisados de forma independente, e na análise baseada exclusivamente em dados moleculares, as relações filogenéticas das subfamílias não foram bem resolvidas e a monofilia de Piestinae também não foi suportada, permanecendo uma subfamília polifilética.

Em contraste com o conjunto de dados moleculares deste mesmo trabalho (SILVA, 2020), Piestinae apareceu como monofilético em análises utilizando dados morfológicos tanto de adultos como larvas, e em grande parte dos testes, a subfamília Osoriinae foi identificada como o grupo-irmão de Piestinae, apesar dos valores de suporte baixos (BS = 13; PP= 68), diferente do que foi observado em nossos resultados, tendo “Piestinae” mais proximamente relacionado a subfamília Oxytelinae.

Em análise de máxima parcimônia utilizando dados morfológicos de adultos, Silva (2020) apresentou Piestinae contendo o gênero *Prognathoides* na base de dois clados, sendo: clado A composto por *Piestus* + (*Hypotelus* + *Eupiestus*) como grupo irmão do clado B composto por: *Siagonium* (incluindo as espécies anteriormente em *Piestoneus*). Esses resultados contrastam com os nossos, que sugerem uma maior proximidade entre *Eupiestus* e *Siagonium*, embora corroborem a associação estreita entre os gêneros *Piestus* e *Hypotelus*.

Dessa forma, os três únicos estudos com filogenia molecular incluindo mais de um táxon de Piestinae (MCKENNA et al. 2015; SILVA, 2020 e o presente estudo) corroboram a não monofilia de Piestinae. Porém, vale salientar que em ambos os

estudos os suportes dos clados gerados são muito baixos quando a posição de *Siagonium* junto a (*Eupiestus* + Osoriinae, parte 1) + (*Piestus* + Oxytelinae) (BS = 54 em McKenna et al., 2015), assim como *Eupiestus* junto a Osoriinae, parte 1 (BS = 78 em McKenna et al., 2015) e por fim, (*Eupiestus* + *Siagonium*) junto a Oxytelinae, no presente estudo, com valor de suporte moderado para MV e baixo para IB (BS= 87; PP = 64).

Portanto, esses resultados demonstram a necessidade de continuação das investigações para delimitar com maior precisão a posição desses táxons, assim como a não monofilia de Piestinae. Isso poderá ser realizado pela inclusão de novos genes, novo táxons terminais e a utilização de dados morfológicos.

Grupo Oxytelina monofilético

Encontramos a linhagem Oxytelina como monofilética em nossas análises, tanto de máxima verossimilhança (MV) quanto de inferência bayesiana (IB), embora com valores de suporte fracos (BS = 56; PP = 80). A monofilia do grupo Oxytelina, proposta por Lawrence e Newton (1982), é sugerida pelos hábitos saprófagos ou micófagos de adultos e larvas, a presença de um intestino posterior longo e em forma de alça, que é comum em ambos os estágios, contrastando com o intestino reto mais curto observado em grupos predominantemente predadores. Além disso, as mandíbulas larvais apresentam um ápice bífido ou mais complexo, corroborando essa classificação.

Nossos resultados se assemelham muito com o que foi proposto por Grebennikov e Newton (2012), onde a linhagem Oxytelina é composta por dois clados A e B, onde o clado A é formado por Piestinae + Oxytelina + Osoriinae e o clado B formado pela família Scaphidiinae. O mesmo resultado é possível observar em nossas análises, com diferenças quanto as relações internas dos gêneros e posições das subfamílias.

Em contraste com os achados de Grebennikov e Newton (2012), nossas análises demonstram a subfamília Oxytelinae em uma posição mais interna dentro do clado A, enquanto Osoriinae aparece como grupo irmão de Oxytelinae + “Piestinae”. No entanto, assim como os autores, também observamos que a subfamília Scaphidiinae é uma linhagem que teria divergido primeiro, constituindo o grupo irmão das demais subfamílias de Oxytelina. Tanto nos resultados de

Grebennikov e Newton (2012) quanto em nossas análises, encontramos a monofilia de três das quatro subfamílias pertencentes ao grupo, apresentando valores de suporte altos, exceto para Scaphidiinae na análise de máxima verossimilhança, sendo: Osoriinae (BS e PP = 100); Oxytelinae (BS = 87 e PP = 100) e Scaphidiinae (BS = 76; PP = 97).

No estudo de McKenna et al. (2015a), o grupo Oxyteline formou um clado com adições de *Megalopinus* Eichelbaum (Megalopsidiinae), *Phloeocharis* Mannerheim (Phloeocharinae), *Trichophya* Mannerheim (Trichophyinae) e Habrocerinae, com suporte diversos (PP = 96; BS = 50). O trabalho também reintegrou as subfamílias Apateticinae e Trigonurinae à linhagem, que anteriormente haviam sido removidas por Grebennikov e Newton (2012). O grupo Oxyteline, em um sentido mais restrito, foi recuperado como monofilético, conforme proposto por Hansen (1997), incluindo apenas Osoriinae, Oxytelinae e Piestinae, com valores de suporte de PP = 98 e BS = 50, excluindo o clado designado como Osoriinae-2.

Adicionalmente, McKenna et al. (2015a) recuperaram Osoriinae como uma subfamília não monofilética, resultado que contrasta com os obtidos no presente estudo. Por outro lado, seus achados indicaram a monofilia de Oxytelinae e Scaphidiinae, o que foi igualmente corroborado neste trabalho.

No estudo de Silva (2020), a linhagem Oxyteline apresentou suas relações filogenéticas internas não bem resolvidas em análise com dados moleculares, assim como, ao utilizar dados morfológicos exclusivamente de larvas. Nesse caso, apenas Scaphidiinae e Piestinae foram recuperadas como clados monofiléticos. Contudo, nas análises baseadas em dados morfológicos de adultos, todas as subfamílias foram recuperadas como monofiléticas.

Silphidae ou Silphinae?

As análises filogenéticas realizadas, utilizando tanto métodos de máxima verossimilhança quanto inferência bayesiana, revelam que a subfamília Silphinae permanece como um clado monofilético e bem suportado, com valores significativos de suporte (BS = 99; PP = 100) (figuras 6 e 7).

Lawrence e Newton (1982) classificaram Silphinae como uma família integrante do Grupo Staphylinide, que abrange a família Staphylinidae, sugerindo, assim, uma relação estreita entre esses grupos. Pesquisas subsequentes indicam

que Silphinae pode ser não apenas uma linhagem derivada no clado Staphylinidae, conforme sugerido por Lawrence e Newton (1982) e Newton e Thayer (1995), mas também pode ser vista como um grupo irmão, de acordo com Grebennikov e Newton (2009, 2012), assim como visto em nossas análises.

Embora exista consenso sobre a monofilia de Silphinae (SIKES, 2016) e sua inclusão na superfamília Staphylinoidea, a relação entre Silphinae e Staphylinidae ainda é debatida. Hatch (1927) foi o primeiro a classificar formalmente os grandes besouros carniceiros como uma subfamília de Staphylinidae, mas sua proposta não foi aceita pela comunidade científica na época. Quase um século depois, Cai et al. (2022) revisitaram essa questão, reanalizando dados de Zhang et al. (2018) e outros estudos que apresentaram resultados semelhantes, e reafirmaram a classificação de Silphinae como uma subfamília de Staphylinidae.

Em trabalho mais recente, após revisarem 21 publicações relevantes sobre a origem evolutiva e a classificação taxonômica de Silphinae, Sikes et al. (2024) concluem que é justificado considerar Silphinae como uma subfamília de Staphylinidae, com forte suporte para sua monofilia, encontrando-se como possível grupo irmão de Tachyporinae. As análises revisadas identificaram uma variedade de possíveis táxons irmãos para Silphinae, mas Tachyporinae foi considerado o grupo irmão mais frequente, aparecendo em 7 das 19 análises que incluíram essa subfamília, conforme observado por McKenna et al. (2015). Essa dualidade na interpretação da relação filogenética entre Silphinae e Staphylinidae ressalta a complexidade da evolução dentro desse grupo de coleópteros.

A posição de Silphinae, situada na base da família Staphylinidae, em nossas análises, levanta questões cruciais sobre sua classificação taxonômica. Apesar do alto valor de suporte, não é possível concluir se Silphinae deve ser considerada uma família independente ou se representa uma subfamília dentro do clado Staphylinidae. Dado que trabalhos recentes têm classificado Silphinae como uma subfamília, adotaremos essa posição em nosso estudo.

CAPÍTULO 2

Estimativas de Tempo de Divergência em Piestinae (Coleoptera, Staphylinidae): Implicações Evolutivas



INTRODUÇÃO

A sistemática filogenética dos besouros tem passado por mudanças significativas, com uma crescente integração de fósseis diretamente nas análises de dados. Essa abordagem tem ganhado destaque na entomologia sistemática, uma vez que a importância dos fósseis para a compreensão das relações evolutivas entre táxons é amplamente reconhecida (PATTERSON, 1981; DONOGHUE et al., 1989; SMITH, 2009; WIENS; MORRILL, 2011; PYRON, 2015). Fósseis de besouros e inclusões em âmbar estão bem preservados em coleções ao redor do mundo, aguardando estudo e descrição (PONOMARENKO, 1995; ROHDENDORF, 1961). Devido à esclerotização robusta de seus corpos e à dureza das élitros, os besouros são bem representados no registro fóssil, com 69% das 214 famílias de coleópteros reconhecidas e 63% das 179 famílias atuais preservadas como fósseis (SMITH; MARCOT, 2015).

A paleontologia de besouros tem avançado significativamente, permitindo novas análises sobre a história evolutiva do grupo. Durante o Permiano Médio (272,3 a 259,8 Ma), transformações como a formação da epipleura dos élitros e o ajuste mais apertado entre os élitros e o abdômen resultaram em um espaço subélitral fechado de forma mais eficiente. No Triássico (252 – 201 Ma), subordens como Adephaga e Myxophaga passaram por uma onda inicial de diversificação, enquanto os Polyphaga eram raros. A diversificação dos Polyphaga ocorreu de forma mais marcante no Jurássico (201,3–145 Ma), com fósseis representativos das superfamílias Elateriformia, Staphyliniformia e Cucujiformia (BEUTEL et al., 2024).

A radiação das angiospermas teve um impacto crucial na macroevolução dos besouros, especialmente na diversificação das linhagens fitófagas. A ascensão das plantas com flores durante o Cretáceo, associada à diversificação das plantas angiospermas, foi um fator importante para a proliferação de besouros, principalmente herbívoros (FARRELL, 1998; FARRELL; SEQUEIRA, 2004; WILF, 2008; GOMEZ-ZURITA et al., 2007; GRATSHEV; ZHERIKHIN, 2003; GRIMALDI; ENGEL, 2005). Além disso, inovações evolutivas, como parcerias com simbioses e a aquisição de novos genes por transferências horizontais, desempenharam papéis decisivos na diversificação dos besouros fitófagos (BEUTEL et al., 2024).

A história evolutiva dos besouros tem sido o tema de vários estudos científicos importantes, como os de Crowson (1975), Ponomarenko (1983, 1986,

1995, 2003), Hunt et al. (2007), McKenna (2011), Smith e Marcot (2015), Cai et al. (2022) e Beutel et al. (2024). A filogenia dos besouros atuais estabilizou-se nos últimos anos (CHE et al., 2017; MCKENNA et al., 2019; TOUSSAINT et al., 2017; ZHANG et al., 2018; CAI et al., 2022), e inúmeras espécies extintas de besouros foram descobertas e descritas, incluindo impressões do Permiano e Mesozoico (KIREJTSHUK et al., 2010, 2014; PONOMARENKO, 2018, 2021; PONOMARENKO; PROKIN, 2015; YAN; BEUTEL; PONOMARENKO, 2017a, 2017b).

Do ponto de vista evolutivo, a família Staphylinidae é considerada uma das linhagens mais antigas da subordem Polyphaga, como indicado por análises de relógio molecular (ZHANG; ZHOU, 2013; BEUTEL et al., 2024). Estudos sugerem que essa linhagem data aproximadamente da época do Triássico Inferior (~249 Ma) e a maioria das linhagens da família começou a irradiar do Jurássico Tardio (~145,9 Ma) ao Eopaleogeno (66–56 Ma) (ZHANG; ZHOU, 2013; BEUTEL et al., 2024).

Dada a imensa diversidade de Staphylinidae, estudos filogenéticos são essenciais para compreender sua evolução e padrões de especiação, além de fornecerem informações relevantes para a conservação da biodiversidade (ZHOU, 2000; THAYER, 2005). Entre os principais objetivos da biologia evolutiva, a datação de eventos de diversificação desempenha um papel fundamental na reconstrução da história evolutiva dos grupos taxonômicos (GAUNT; MILES, 2002). Utilizando o método do relógio molecular e registros fósseis disponíveis, é possível inferir tempos de divergência entre linhagens e estimar a cronologia de eventos de ramificação em árvores filogenéticas (ZHANG; ZHOU, 2013).

Diversos avanços já foram feitos na estimativa da escala temporal da evolução de besouros utilizando a abordagem do relógio molecular (FARRELL, 1998; PRÜSER; MOSSAKOWSKI, 1998; GÓMEZ-ZURITA et al., 2000, 2007; HUNT et al., 2007; RUIZ et al., 2009). No entanto, até o momento, nenhuma estimativa de tempo de divergência foi realizada especificamente para a subfamília Piestinae e subfamílias da linhagem Oxytelina. Assim, neste capítulo, conduzimos uma inédita análise filogenética calibrada no tempo para Piestinae e demais subfamílias do grupo informal Oxytelina.

OBJETIVO

- Estimar os tempos de divergência das linhagens de Piestinae e demais subfamílias de Oxytelina.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise para inferir o tempo de divergência dos clados

A seleção de táxons para análise de tempo de divergência seguiu a mesma amostragem descrita no capítulo 1 (tabela 2). A matriz foi composta por cinco genes: COI, Wg, 28S, CAD e Argk, somando um total de 5.735 pares de bases alinhados. Os procedimentos de extração, amplificação, sequenciamento, edição de sequências e alinhamento estão devidamente descritos no capítulo 1.

Para as estimativas de tempo, a idade da raiz foi inicialmente calibrada com base em estudos anteriores sobre a separação entre *Staphylinidae* e *Agyrtidae* (com *Leiodidae* não incluído na amostragem), conforme Beutel et al. (2024), que estimaram esse evento em aproximadamente 210,0 Ma. Um segundo ponto de calibragem foi definido para a origem de *Agyrtidae*, também com base nas estimativas de Beutel et al., datada em cerca de 150 Ma.

Para a calibração da árvore (tabela 4), utilizamos três fósseis, correspondendo ao grupo externo: o fóssil †*Stenus (Nestus) imputribilis* Ryvkin 1988 (Staphylinidae: Steninae), do Cretáceo Tardio, Tenkinskii, Rússia; o fóssil †*Sinoxytelus euglypheus* Yue et al. 2010 (Staphylinidae: Oxytelinae) e o fóssil †*Oxyporus yixianus* Yue et al., 2011 (Staphylinidae: Oxyporinae), ambos do Eocretáceo, Formação Yixian, na China.

Os fósseis utilizados para calibração foram selecionados com base no trabalho de Zhang e Zhou (2013), que já forneceu informações confiáveis sobre os pontos de divergência dentro da família Staphylinidae. A escolha desses fósseis se deu pela sua boa preservação e pela datação precisa, permitindo uma calibração mais robusta da árvore filogenética. Embora a datação de fósseis sempre envolva alguma margem de erro, esses fósseis foram os mais adequados para garantir a precisão nas estimativas dos tempos de divergência. Para o grupo interno, utilizamos o fóssil †*Propiestus archaicus* Yamamoto et al. 2018 (Staphylinidae: Piestinae), encontrado em âmbar birmanês em Mianmar, Sudeste da Ásia (tabela 4).

Tabela 4. Pontos de calibração fóssil e parâmetros dos *priors* implementados no BEAST2 para as corridas de MCMC.

Identificação	Localização	Idade	Implementação BEAST	Valores de distribuição (em milhões de	Referência
Raiz: divergência Staphylinidae e Agyrtidae (sensu Beutel et al. 2024)	–	210.0 Ma	offset = 200 stdev = 0.7 mean = 1.0	minimum bound = 203.0 medium value = 210.0 95% quartile = 232.0	Zhang e Zhou (2013), Beutel et al. 2024
Clado: Agyrtidae	–	150 Ma	offset = 145.0 stdev = 0.6 mean = 2.3	minimum bound = 149.0 medium value = 157.0 95% quartile = 172.0	Beutel et al. 2024
<i>Oxyporus yixianus</i> (Localidade tipo: 111714)	Formação Yixian da China	127.5 Ma (130.0 – 125.4)	offset = 117,7 stdev = 0.65 mean = 2.0	minimum bound = 120.0 medium value = 125.0 95% quartile = 139.0	Yue et al., 2011
<i>Stenus (Nestus) imputribilis</i> (Localidade tipo: 105375)	Tenkinskii, Federação Russa	80.0 Ma (83.5 – 70.6)	offset = 70.2 stdev = 0.6 mean = 1.7	minimum bound = 72.2 medium value = 75.7 95% quartile = 84.9	Ryvkin (1988)
<i>Sinoxytelus euglypheus</i> (Localidade tipo: 111714)	Formação Yixian da China	127.5 Ma (130.0 – 125.4)	offset = 117,7 stdev = 0.65 mean = 2.0	minimum bound = 120.0 medium value = 125.0 95% quartile = 139.0	Yue et al. (2010)
<i>Propietus archaicus</i> (Localidade tipo: 184691)	Mianmar, Sudeste da Ásia	99.6 Ma (99.6 – 93.5)	offset = 89.0 stdev = 0.6 mean = 2.0	minimum bound = 91.8 medium value = 96.4 95% quartile = 109.0	Yamamoto et al. (2018)

Os tempos de divergência foram estimados utilizando o software BEAST2 v2.7 (BOUCKAERT et al., 2014), executado na plataforma CIPRES. Para todas as partições, foram adotados os mesmos modelos de relógio molecular e de árvore. Especificamente, foi empregado um modelo de substituição GTR com distribuição Gamma para heterogeneidade entre sítios, em conjunto com um modelo de Relógio Relaxado com taxas otimizadas (Relaxed Clock, log-normal), e modelo de especiação de Yule para a reconstrução da árvore cronogramada. Todos os parâmetros utilizados para a implementação dos priors são apresentados na tabela 4.

Foi conduzida uma corrida de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) por 100 milhões de gerações, amostrando a cada 5.000 gerações e descartando as primeiras 25% árvores com o burn-in. A convergência das corridas foi verificada utilizando o Tracer v. 1.7.1 através dos escores do tamanho da amostra efetivo (ESS > 600). A árvore final foi criada utilizando o programa TreeAnnotator 1.7.0 sob a

opção “Maximum clade credibility tree”. A árvore foi então editada no FigTree v. 1.4.4, onde adicionamos as barras que representam 95% da maior densidade posterior (HDP). Para uma melhor visualização e discussão apresentamos uma árvore editada no software Inkscape 1.0.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As topologias de árvore geradas para o cálculo do tempo de divergência no BEAST2 via CIPRES foram congruentes com as análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, apresentadas no capítulo 1, inclusive pela incerteza quanto a posição de *Siagonium* e *Eupiestus*, que foram recuperadas em diferentes posições, mais proximamente relacionados à linhagem da subfamília Oxytelinae.

A análise bayesiana com relógio molecular relaxado, baseada nos dados concatenados dos cinco genes (28S, CAD, ArgK, COI e WG) (figura 8), indica que a origem de Staphylinidae ocorreu no início do Triássico Tardio, por volta de 219,58 Ma, com intervalo de credibilidade (HPD 95%) entre 191,0 e 252,8 Ma. Essa estimativa é compatível com evidências filogenéticas que sustentam uma linhagem antiga e bem estabelecida da família. Nossos resultados contrastam com os de Zhang e Zhou (2013), que propuseram uma separação mais precoce, no Triássico Inicial (~243,35 Ma), mas se aproximam mais dos dados de Beutel et al. (2024), que situam a origem de Staphylinidae e “Silphidae” em torno de 200 Ma.

Em relação às demais subfamílias externas à linhagem Oxytelinae, nossa topologia apresentou posicionamentos concordantes com as análises do capítulo anterior. Steninae teve sua origem estimada em 78,07 Ma (HPD de 95%: 71,0–87,7 Ma), enquanto Oxyporinae surgiu há aproximadamente 123,40 Ma (HPD de 95%: 118,9–129,7 Ma). O clado Aleocharinae + “Tachyporinae” começou a se diferenciar por volta de 128,44 Ma. Paederinae teve sua separação temporal estimada em 145,6 Ma (HPD de 95%: 116,1–175,2 Ma), ao passo que Staphylininae surgiu posteriormente, em torno de 122,83 Ma (HPD de 95%: 81,4–158,9 Ma).

A linhagem Oxytelinae apresenta uma origem estimada em 173,30 Ma, com intervalo HPD de 95% entre 150,9 e 195,7 Ma. Esse valor é relativamente recente em comparação com a diversificação inicial de Staphylinidae, mas ainda indica uma diferenciação significativa. A ramificação inicial do clado A (Piestinae + Osoriinae + Oxytelinae) ocorreu por volta de 167,27 Ma, enquanto o clado B, composto

exclusivamente por Scaphidiinae, começou a se diversificar um pouco mais tarde, em 14,07 Ma (HPD 95%: 107,6–178,7 Ma). De acordo com nossa topologia, a subfamília Scaphidiinae iniciou sua separação no Jurássico Tardio, com posterior diversificação dos grupos internos no Cretáceo Inicial.

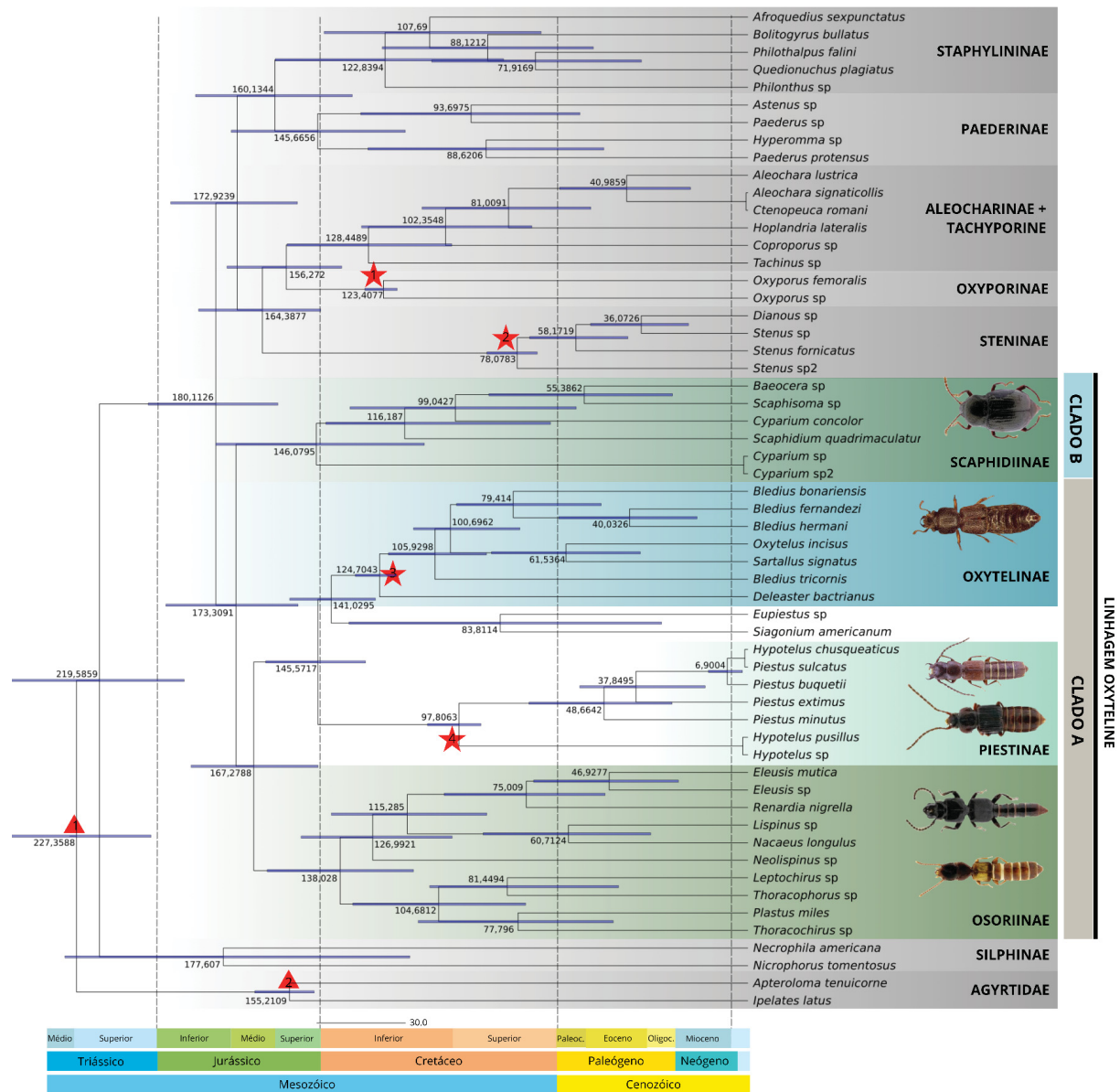


Figura 8. Consenso Bayesiano dos dados combinados dos marcadores 28S, COI, Wingless, Argk e CAD, e seis pontos de calibração, de Staphylinidae + Agyrtidae (Coleoptera). Valores correspondem ao tempo médio dos nós, barras indicam o intervalo de 95% das maiores densidades posteriores dos tempos de divergências estimados para os nós de interesse. 1 e 2 (triângulos) correspondem a pontos de calibração secundária: 1 = raiz; 2 = Agyrtidae. 1-4 (estrelas) correspondem à pontos

de calibração baseados em fósseis: 1 = *Oxyporus yixianus*; 2 = *Stenus (Nestus) imputribilis*; 3 = *Sinoxytelus euglypheus* e 4 = *Propiestus archaicus*.

Tabela 5. Tempos de divergência e valores de suporte dos clados mais importantes. Idades em milhões de anos (Ma). Valores de suporte representando bootstrap ultra-rápido obtido pela Máxima Verossimilhança e a Probabilidade Posterior (PP – %) da Inferência Bayesiana.

Clado	Idade	HPD 95%	Bootstrap	PP
Agyrtidae	155.2	146,6 - 167,2	100	100
Staphylinidae	218.6	191,0 - 252,8	100	100
Silphinae	176.6	-	99	100
Linhagem Oxytelinae	172.7	150,9 - 195,7	71	81
Scaphidiinae	145.9	107,6 - 178,7	81	98
Osoriinae	137.5	113,3 - 162,4	100	100
Oxytelinae	124.7	118,8 - 132,8	96	96
“Piestinae” (<i>Hypotelus</i> + <i>Piestus</i>)	97.7	90,5 - 108,1	90	98
“Piestinae” (<i>Siagonium</i> + <i>Eupiestus</i>)	91.2	-	91	-
Steninae	77.9	71,0 - 87,7	100	100
Oxyporinae	123.4	118,9 - 129,7	100	100
Aleocharinae	80.8	-	99	98
Aleocharinae + “Tachyporinae”	128.1	-	100	99
Paederinae	145.2	116,1 - 175,2	85	99
Staphylininae	122.1	81,4 - 158,9	98	100
Paederinae + Staphylininae	159.9		68	97

Osoriinae, assim como nas demais análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana apresentadas no capítulo 1, foi recuperada como uma subfamília monofilética, formando um clado irmão de Oxytelinae. Dessa forma, a subfamília teve sua origem entre o fim do Jurássico e a primeira metade do Cretáceo (~138,28 Ma, HPD de 95%: 113,3–162,4 Ma). No estudo de Zhang e Zhou (2013), na análise de tempo evolutivo, os representantes de Osoriinae indicam um evento similar por volta de ~152 Ma.

A subfamília Oxytelinae apresenta uma origem estimada em ~124,70 Ma, datação muito próxima à idade do fóssil utilizado na calibração desta análise

(*Sinoxytelus euglypheus* - 127,5 Ma). No trabalho de Zhang e Zhou (2013), apesar de utilizarem o mesmo fóssil, os autores estimam que a subfamília iniciou sua irradiação um pouco mais tarde, por volta de 100 Ma.

Os gêneros paleárticos de Piestinae (*Siagonium* e *Eupiestus*) foram agrupados com representantes da linhagem Oxytelinae em nossa análise de tempo de divergência, sugerindo uma separação evolutiva ocorrida há aproximadamente 141,02 milhões de anos, durante o Cretáceo Inicial. No entanto, essa formação de clado pode representar um artefato resultante da ausência de dados genéticos para alguns táxons incluídos na análise.

Contudo, nossas análises estimaram o clado *Siagonium* + *Eupiestus* com uma datação aproximada de 83,81 Ma, o que contrasta com os resultados de Zhang e Zhou (2013), que, sem o fóssil *Propiestus archaicus* (posteriormente descrito por Yamamoto et al., 2018), recuperaram *Siagonium* agrupado com *Oxyporus* (Oxyporinae), com uma separação inicial estimada em torno de 160 Ma. No presente estudo, o clado Piestinae, representado pelos gêneros neotropicais *Hypotelus* e *Piestus*, apresentou uma idade inicial estimada de 97,80 Ma (HPD de 95%: 90,5–108,1 Ma).

CAPÍTULO 3

Filogenia de Piestinae (Coleoptera, Staphylinidae) com base em evidência total: Integração de dados morfológicos e moleculares



INTRODUÇÃO

Como visto no capítulo 1, a subfamília Piestinae Erichson, 1839, considerada uma das mais antigas entre os Staphylinidae, é um grupo cosmopolita composto por 115 espécies distribuídas em nove gêneros, sendo seis existentes e três extintos (NEWTON, 2025, CARON et al., no prelo). Dos gêneros atuais, dois estão na região Neotropical, dois na região Australiana, um restrito ao Paleártico oriental e um gênero Holártico. As espécies habitam principalmente sob cascas de árvores e madeira em decomposição, podendo ocasionalmente ocorrer em serapilheira (CARON et al. 2012).

Embora sua biologia ainda seja pouco conhecida, acredita-se que a maioria dos representantes da subfamília seja saprófaga, com algumas espécies possivelmente micófagas, conforme sugerido por Crowson e Ellis (1969) e reforçado por Thayer (2016). Historicamente, Piestinae foi definida com base em traços plesiomórficos e utilizada como uma categoria para agrupar estafilinídeos de difícil classificação (CARON et al. 2012). Entretanto, avanços recentes tornaram sua definição mais restrita (CARON et al., 2012; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; BORTOLUZZI et al., 2017), embora sua monofilia continue sendo debatida, com estudos sugerindo uma possível parafilia em relação a Osoriinae e Oxytelinae (THAYER, 2016; GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; MCKENNA et al., 2015a).

Diversos estudos filogenéticos contribuíram para o entendimento das relações dentro de Piestinae, incluindo análises baseadas em morfologia e dados moleculares. Análises cladísticas anteriores focaram nos gêneros *Piestus*, *Propiestus* (fóssil), *Hypotelus* e *Siagonium* (CARON et al., 2012; BORTOLUZZI et al., 2017; YAMAMOTO et al. 2018; CARON et al., 2025; CARON et al., no prelo), mas não testaram diretamente a monofilia da subfamília.

A monofilia de Piestinae foi contestada, principalmente, em dois trabalhos os quais investigavam o relacionamento de diversas subfamílias de Staphylinidae, um deles somente com dados moleculares (MCKENNA et al., 2015) e outro somente com dados morfológicos (GREBENNIKOV; NEWTON, 2012). Diante disso, recentemente estudos foram direcionados para a investigação focando Piestinae. Assim, Silva (2020) investigou a subfamília através de três conjuntos de dados, no qual recuperou a monofilia através dos dados morfológicos de adultos e larvas

(SILVA, 2020 - capítulo 1 e 2), mas não recuperou com dados moleculares (SILVA, 2020 - capítulo 3).

A investigação conduzida por Silva (2020), com base em dados morfológicos, apresentou uma representatividade taxonômica satisfatória, algo que não foi alcançado na análise molecular, tanto pela baixa diversidade de táxons quanto pela limitada quantidade de genes avaliados. Assim, surge a proposta de investigação de Piestinae com um escopo molecular ampliado, incorporando um maior número de táxons e genes. Essa abordagem, apresentada no capítulo 1 desta tese, recuperou Piestinae como um grupo artificial. Embora esse estudo tenha representado um avanço significativo ao gerar dados moleculares inéditos para táxons neotropicais, a inclusão de representantes de outras regiões biogeográficas foi limitada, em razão das dificuldades na obtenção de material para análise.

Portanto, diante da incongruência entre os resultados obtidos por Silva (2020) e aqueles apresentados no capítulo 1, torna-se evidente a necessidade de integrar todas as fontes de dados disponíveis (morfologia de adultos, morfologia larval e dados moleculares) a fim de responder, de forma mais robusta, à questão sobre a monofilia da subfamília Piestinae.

A ênfase nos dados moleculares em detrimento dos morfológicos tem sido amplamente adotada na inferência filogenética contemporânea. No entanto, a abordagem de evidência total, que integra dados morfológicos e moleculares, permite uma estimativa filogenética mais abrangente e menos suscetível a vieses associados a cada tipo isolado de dado. Ao combinar diferentes fontes de informação, essa abordagem considera o máximo possível de evidências disponíveis, resultando em hipóteses filogenéticas mais robustas e bem fundamentadas (EERNISSE, 1993).

Dessa forma, neste capítulo, buscamos ampliar o conhecimento existente sobre o grupo e reavaliar a subfamília Piestinae à luz de dados recentes (ainda não publicados), por meio da integração de sequências de cinco marcadores genéticos distintos com caracteres morfológicos. Além de investigar a hipótese de monofilia da subfamília, almeja-se alcançar uma compreensão mais robusta das relações filogenéticas internas de Piestinae. Espera-se, assim, contribuir para uma revisão sistemática do grupo, esclarecendo questões taxonômicas pendentes e propondo uma classificação mais precisa e estável.

OBJETIVOS

- Integrar dados moleculares e morfológicos em uma abordagem de evidência total para investigar a monofilia e posicionamento filogenético de Piestinae, assim como dos seus grupos internos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Examinado

Os dados morfológicos compreendem uma matriz com caracteres de larvas e adultos, obtidos do trabalho de Silva, 2020 (dados não publicados). Desse trabalho estavam disponíveis 22 dos 57 terminais incluídos em nossa matriz molecular (tabela 2), a qual manteve-se a mesma do capítulo 1 deste trabalho.

Como algumas espécies amostradas no conjunto de dados moleculares não se sobrepuseram à nossa amostragem para a matriz morfológica, criamos treze quimeras interespecíficas no nível genérico para acomodar a fusão desses dados díspares (tabela 6). As quimeras são mostradas na árvore combinada pelo nome do gênero sem indicativo de espécie e identificadas por um “ * ”.

Tabela 6. Lista de táxons selecionados para a matriz morfológica e respectivos terminais selecionados da matriz molecular para compor as quimeras.

Subfamília	Espécie	Quimera	Espécie da matriz molecular para formar a quimera	Nome do terminal na filogenia combinada
Piestinae	<i>Eupiestus feae</i>	Sim	<i>Eupiestus</i> sp	<i>Eupiestus</i> *
Piestinae	<i>Eupiestus scupticolis</i>	Não	-	<i>Eupiestus scupticolis</i>
Piestinae	<i>Hypotelus castaneus</i>	Sim	<i>Hypotelus</i> sp	<i>Hypotelus</i> *
Piestinae	<i>Hypotelus pusillus</i>	Não	-	<i>Hypotelus pusillus</i>
Piestinae	<i>Piestus bicornis</i>	Sim	<i>Piestus buquetii</i>	<i>Piestus</i> *
Piestinae	<i>Piestus minutus</i>	Não	-	<i>Piestus minutus</i>
Piestinae	<i>Piestus sulcatus</i>	Não	-	<i>Piestus sulcatus</i>
Piestinae	<i>Siagonium mjobergi</i>	Não	-	<i>Siagonium mjobergi</i>
Piestinae	<i>Siagonium oharai</i>	Não	-	<i>Siagonium oharai</i>

Piestinae	<i>Siagonium punctatum</i>	Sim	<i>Siagonium americanum</i>	<i>Siagonium</i> *
Piestinae	<i>Siagonium vittatum</i>	Não	-	<i>Siagonium vittatum</i>
Oxytelinae	<i>Oxytelus</i> sp	Sim	<i>Oxytelus incisus</i>	<i>Oxytelus</i> *
Oxytelinae	<i>Bledius hermani</i>	Não	-	<i>Bledius hermani</i>
Osoriinae	<i>Nacaeus</i> sp	Sim	<i>Nacaeus longulus</i>	<i>Nacaeus</i> *
Osoriinae	<i>Lispinus</i> sp	Sim	<i>Lispinus</i> sp	<i>Lispinus</i> *
Osoriinae	<i>Eleusis humilis</i>	Sim	<i>Eleusis</i> sp	<i>Eleusis</i> *
Osoriinae	<i>Leptochirus scoriaceus</i>	Sim	<i>Leptochirus</i> sp	<i>Leptochirus</i> *
Osoriinae	<i>Thoracophorus sculptus</i>	Sim	<i>Thoracophorus</i> sp	<i>Thoracophorus</i> *
Scaphidiinae	<i>Scaphisoma</i> sp	Sim	<i>Scaphisoma</i> sp	<i>Scaphisoma</i> *
Aleocharinae	<i>Aleochara bonariensis</i>	Sim	<i>Aleochara signaticollis</i>	<i>Aleochara</i> *
Staphylininae	<i>Philonthus</i> sp	Sim	<i>Philonthus</i> sp	<i>Philonthus</i> *

Construir quimeras concatenando dados de espécies diferentes não é o ideal, pois táxons distintos podem ter informações filogenéticas conflitantes (ARRIAGA-VARELA et al., 2023), no entanto, esta é uma prática padrão na sistemática filogenética quando a relação filogenética presumida entre dois táxons, geralmente espécies do mesmo gênero, é considerada próxima o suficiente no contexto de outros táxons amostrados incluídos nas análises (ROBERTSON; MOORE, 2017; ORLOV et al., 2021, CARON et al., 2025).

Concatenação de dados e análise filogenética

A matriz molecular seguiu todas as configurações estabelecidas no capítulo 1, incluindo o alinhamento das sequências, particionamento dos dados e os modelos evolutivos adotados. As duas matrizes foram concatenadas utilizando o software PhyloSuite. O esquema de particionamento de melhor ajuste e os modelos evolutivos para a matriz molecular e morfológica foram determinados individualmente utilizando o software PhyloSuite (ZHANG et al. 2020), em conjunto com o plug-in ModelFinder, aplicando o critério de informação de Akaike para ambos.

A análise de máxima verossimilhança (ML) com a matriz combinada foi realizada usando IQTREE 2 (MINH et al. 2020). Um bootstrap ultrarrápido (UFB) com 1000 réplicas foi aplicado para estimar o suporte para os nós hipotéticos. A árvore filogenética final foi observada anteriormente no FigTree v1.4.4 e editada no Inkscape 1.0.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de dados combinados compreendeu 238 caracteres morfológicos (sendo 164 de adulto e 74 caracteres de larva) e cinco marcadores genéticos somando 5.735 pares de base. O esquema de partição selecionado e os modelos correspondentes foram: GTR+I+G4 para a matriz molecular e MK+FQ para a matriz morfológica.

A monofilia de Piestinae foi recuperada na análise combinada, com alto suporte no nó correspondente (BS = 99). A linhagem é composta por dois principais clados, um reunindo as espécies do gênero *Siagonium* + *Prognathoides*, e outro clado reunindo as espécies de *Eupiestus* + o clado mais distal restrito aos gêneros neotropicais (*Hypotelus* e *Piestus*) (figura 9).

A linhagem Oxytelinae foi recuperada como monofilética e dividida em dois clados principais: Clado A, que inclui as subfamílias Oxytelinae, Piestinae e Osoriinae, e Clado B, correspondente à subfamília Scaphidiinae. Dentro do Clado A, foram identificados dois subclados: um deles posiciona Osoriinae como grupo-irmão de Piestinae, embora com suporte baixo (BS = 57), enquanto o outro subclado confirma a monofilia de Oxytelinae (BS = 99), que é recuperada como grupo-irmão de Osoriinae + Piestinae (figura 9). O Clado B, é formado exclusivamente pela subfamília Scaphidiinae com um bom suporte (BS = 85).

Assim como nas análises anteriores (IB e MV) com dados exclusivamente moleculares (capítulo 1 dessa tese), algumas linhagens incluídas neste estudo, como Staphylinine e Tachyporine, apresentaram baixa resolução. No entanto, as subfamílias foram, em sua maioria, recuperadas como monofiléticas e bem suportadas, com exceção de “Tachyporinae”, que foi identificada como parafilética em relação à subfamília Aleocharinae.

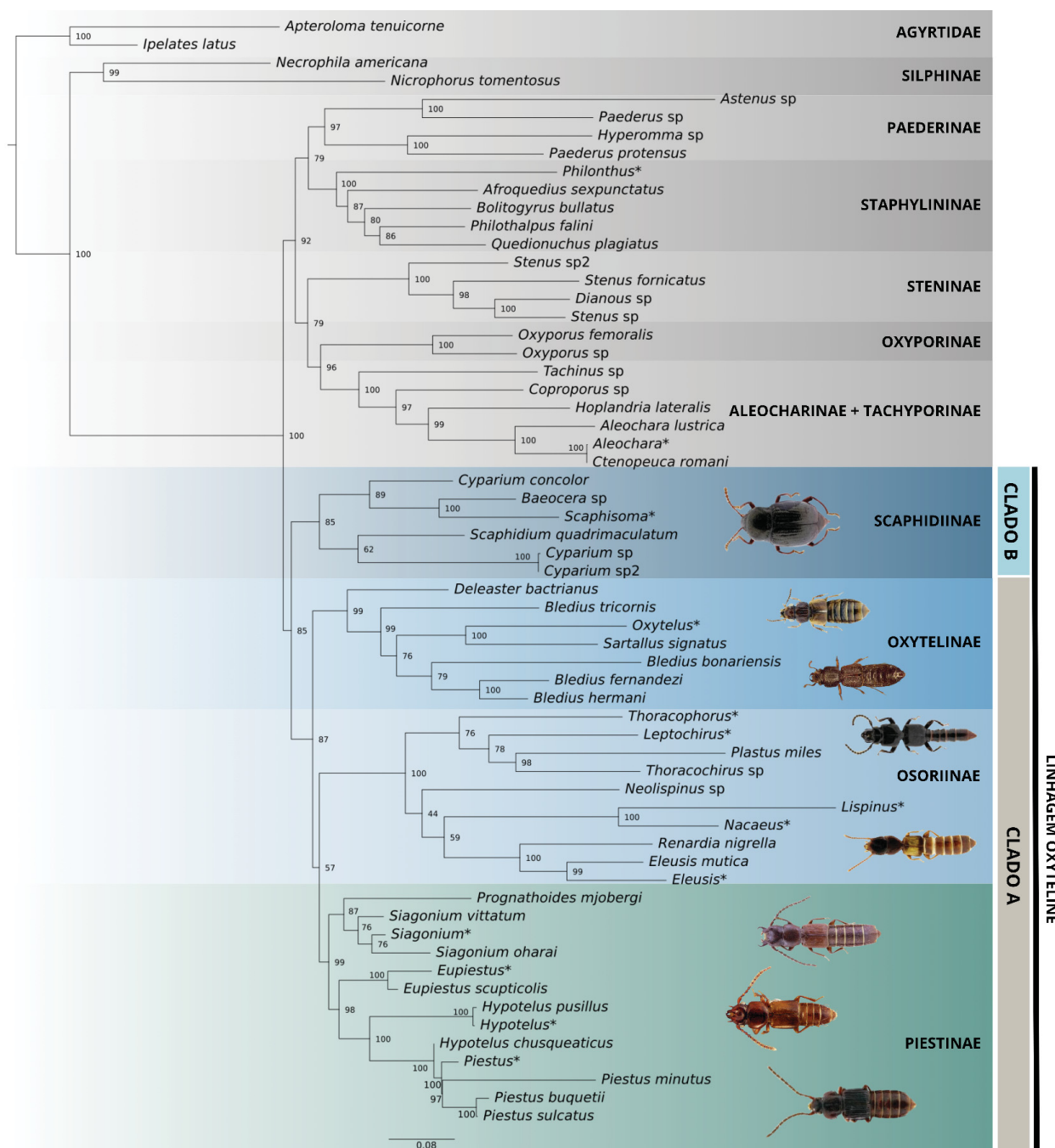


Figura 9. Filograma de Máxima Verossimilhança das sequências combinadas de 28S, CAD, Argk, COI e WG, concatenadas com uma matriz de dados morfológicos (238 caracteres: 164 de adulto e 74 de larva) da linhagem Oxytelinae. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.

A subfamília Staphylininae manteve-se como grupo-irmão de Paederinae, embora com suporte baixo (BS = 79). Steninae foi novamente recuperada como um grupo monofilético com suporte máximo, posicionada na base do clado Steninae +

(Oxyporinae + (“Tachyporinae” + Aleocharinae)) conforme também observado nas análises baseadas somente com dados moleculares (figuras 6 e 7). Além disso, a subfamília Silphinae foi consistentemente recuperada como monofilética e bem suportada (BS = 99), permanecendo como grupo-irmão de todas as demais subfamílias de Staphylinidae aqui amostradas.

Monofilia de Piestinae

Na análise de evidência total, conseguimos a monofilia de Piestinae, integrando dados morfológicos de adultos e larvas com informações genéticas dos cinco genes (figura 9 e 10). Essa abordagem revelou um cenário distinto em relação ao resultado obtido exclusivamente com dados moleculares, onde a monofilia de Piestinae não foi recuperada.

A inclusão de dados morfológicos foi fundamental para reposicionar os gêneros *Eupiestus* e *Siagonium*, que, quando analisados apenas com dados moleculares, não foram recuperados como integrantes de Piestinae. Na análise combinada, esses gêneros foram realocados no clado, formando um grupo monofilético bem suportado (BS = 99). Este resultado destaca o papel essencial das características morfológicas na recuperação das relações evolutivas dentro de Piestinae, sugerindo que a exclusividade do uso de dados moleculares pode ser, pelo menos no momento, insuficiente, especialmente devido à escassez de dados moleculares para táxons de grupos não neotropicais.

A monofilia de Piestinae, recuperada por meio da análise integrada de dados morfológicos e moleculares, contrasta com os achados de Grebennikov e Newton (2012), baseados em morfologia, e de McKenna et al. (2015a), fundamentados em dados moleculares. Por outro lado, esse resultado corrobora com as conclusões de Silva (2020), obtidas a partir de análises exclusivas de caracteres morfológicos. É importante destacar que os dois primeiros estudos não tinham como foco específico a subfamília Piestinae, mas sim a investigação de relações filogenéticas em uma escala mais ampla dentro de Staphylinidae.

Nossos resultados combinados apresentam grande similaridade com as análises de máxima parcimônia e inferência bayesiana baseadas em dados morfológicos de adultos e larvas realizadas por Silva (2020). Em ambos os estudos, Piestinae é recuperada como uma subfamília monofilética, posicionada como grupo

irmão de Osoriinae — embora, esse agrupamento tenha sido sustentado por valores relativamente baixos de suporte, tanto no trabalho de Silva (BS = 13; PP = 68), como em nossa análise (BS = 57).

Segundo Silva (2020), a monofilia de Piestinae é sustentada por caracteres sinapomórficos, entre os quais se destacam: escleritos cervicais inseridos no tórax e com ápice bilobado; élitros com estrias suturais puntiformes e estriadas (caractere 69:2); margem posterior dos élitros quilhada e tergum X com a metade basal triangular e lados emarginados.

Além de corroborarem a monofilia de Piestinae e sua proximidade com Osoriinae, ambos os trabalhos também convergem quanto à estrutura filogenética geral da subfamília, revelando dois clados principais. O clado A é composto pelos gêneros *Eupiestus*, *Piestus* e *Hypotelus*, enquanto o clado B inclui *Prognathoides* e *Siagonium*, sendo o clado A recuperado como grupo irmão do clado B. No entanto, os estudos diferem nas relações internas entre esses gêneros, refletindo variações topológicas entre as análises.

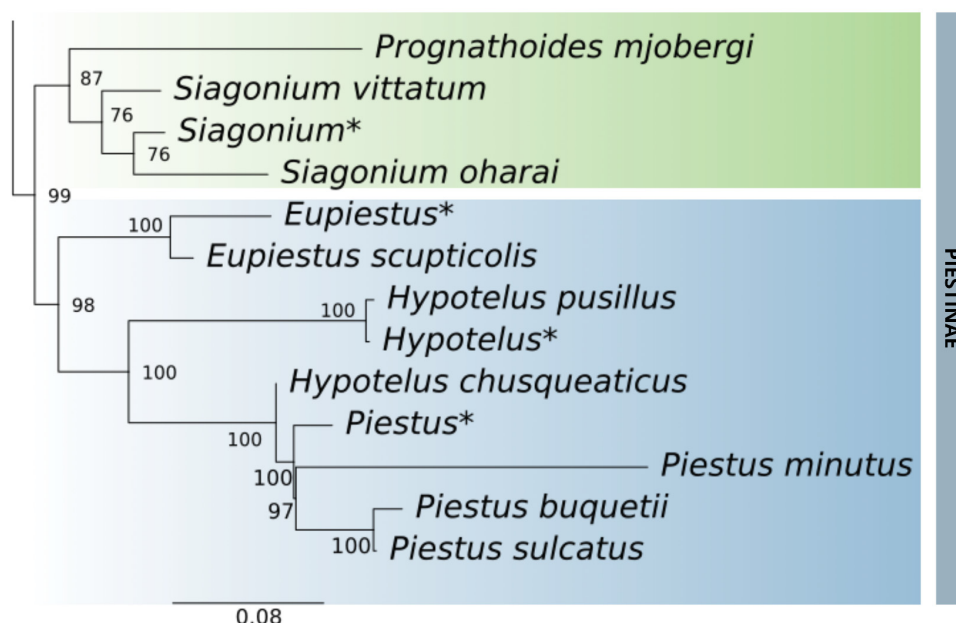


Figura 10. Destaque para a subfamília Piestinae do Filograma de Máxima Verossimilhança em análise de total evidência, combinando 28S, CAD, Argk, COI e WG, concatenadas com a matriz de dados morfológicos (238 caracteres: 164 de adulto e 74 de larva) da linhagem Oxytelinae. Valores de Bootstrap ultra-rápido são fornecidos acima dos ramos. Linhagens recuperadas na topologia apresentada estão destacadas em cores.

Tanto no trabalho de Silva (2020) quanto em nossos resultados, observa-se uma relação de proximidade entre os gêneros *Siagonium* e *Prognathoides*. Em nossas análises, esses dois gêneros formam um agrupamento com divergência mais antiga dentro de Piestinae, com suporte forte (BS = 87). Já no estudo de Silva (2020), *Siagonium* ocupa uma posição mais distal, associando-se consistentemente a *Piestoneus*, atualmente sinonimizado com *Siagonium* por Caron et al. (no prelo), em todas as análises (com dados de adultos, larvas, e combinados), com valores de suporte muito baixos (BS = 40–52; PP = 53–58).

Outra similaridade entre nossos resultados e os obtidos por Silva (2020) diz respeito à proximidade evolutiva entre os gêneros *Piestus*, *Eupiestus* e *Hypotelus*. Em nossas análises, *Eupiestus* é recuperado como ramo externo ao clado formado por (*Hypotelus* + *Piestus*), com alto suporte (BS = 98). Já em Silva (2020), observa-se uma relação mais próxima entre *Eupiestus* e *Hypotelus*, com *Piestus* ocupando uma posição mais externa no agrupamento, embora com baixos valores de suporte (BS = 23–33; PP = 57–65). Apesar dessas diferenças topológicas, ambos os estudos convergem ao indicar uma relação próxima entre esses gêneros, reforçando a consistência desse agrupamento.

Grupo Oxyteline monofilético

Nossa análise de máxima verossimilhança (MV) utilizando dados combinados (morfológicos e moleculares) sustentou a monofilia da linhagem Oxyteline, com valor de suporte relativamente alto (BS = 85). Essa proposta de monofilia, originalmente apresentada por Lawrence e Newton (1982), é apoiada por características compartilhadas entre os membros da linhagem, como os hábitos saprófagos ou micófagos tanto de adultos quanto de larvas, além de um intestino posterior longo e em forma de alça, presente em ambos os estágios de desenvolvimento.

Silva (2020) também aponta como caracteres sinapomórficos que sustentam a monofilia da linhagem: a inserção antenal oculta sob uma crista ou elevação em forma de plataforma nas laterais da fronte, a presença de crista epipleural nos élitros e a ausência de esclerito transversal nas cavidades mesocoxais.

De maneira semelhante ao que foi proposto por Grebennikov e Newton (2012), que dividiram a linhagem Oxytelinae em dois clados principais (A e B), nossos resultados também recuperaram essa estrutura. O Clado A inclui as subfamílias Piestinae, Oxytelinae e Osoriinae, enquanto o Clado B é composto pela subfamília Scaphidiinae, posicionada na base da linhagem. Dentro do Clado A, nossos dados corroboram a organização interna das subfamílias, com Oxytelinae sendo o grupo-irmão de Piestinae + Osoriinae. Entretanto, ao contrário de Grebennikov e Newton (2012), nossos resultados recuperaram a monofilia de todas as quatro subfamílias da linhagem Oxytelinae, com valores de suporte máximo para Osoriinae (BS = 100), e valores altos para Oxytelinae (BS = 99); Piestinae (BS = 99) e Scaphidiinae (BS = 85).

Em nossa análise filogenética combinada (figura 9), Osoriinae foi recuperada como um grupo monofilético com alto suporte (BS = 100). Além disso, enquanto a abordagem molecular isolada indicou Osoriinae como grupo-irmão de (Oxytelinae + Piestinae) (figuras 6 e 7), nossa análise combinada revelou uma relação diferente (figuras 9 e 10), colocando Osoriinae como grupo-irmão de Piestinae, embora com suporte mais baixo (BS = 57). Esses resultados corroboram as conclusões de Grebennikov e Newton (2012) e Silva (2020), que sustentaram a monofilia de Osoriinae (figura 11).

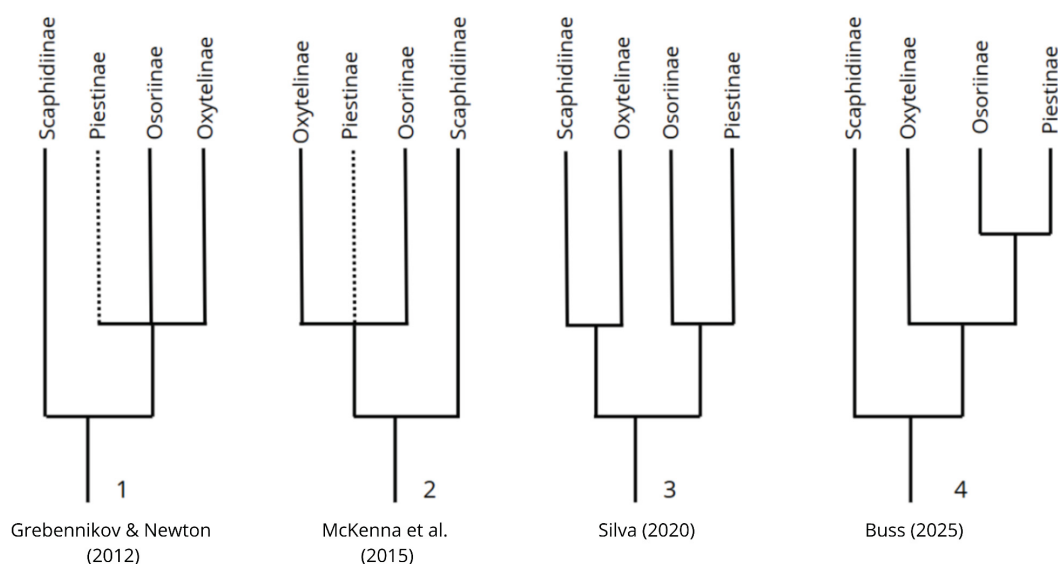


Figura 11. Esquemas filogenéticos propostos por diferentes autores, representando hipóteses alternativas de relações evolutivas para Piestinae. 1: Grebennikov e Newton (2012), dados morfológicos de adultos; 2: McKenna et al. (2015a), dados

moleculares; 3: Silva (2020), dados morfológicos de adultos; 4: Buss (2025), evidência total, realizada nesse estudo.

Em relação ao trabalho de Silva (2020), que, com dados morfológicos de adultos em análise de máxima parcimônia, dividiu a linhagem Oxytelinae em dois clados (clado A: Piestinae + Osoriinae; clado B: Oxytelinae + Scaphidiinae), nossas análises recuperaram uma estrutura distinta (figura 11). A subfamília Oxytelinae foi posicionada em um clado junto com Osoriinae e Piestinae, enquanto Scaphidiinae formou um clado independente (figuras 9 e 10).

CONCLUSÕES

Este estudo representa a primeira tentativa de investigar a monofilia da subfamília Piestinae por meio de uma análise de evidência total, combinando dados morfológicos e moleculares. O trabalho trouxe resultados dispares: enquanto os dados combinados sustentaram a monofilia de Piestinae (capítulo 3), os dados moleculares, isoladamente, não corroboraram essa condição (capítulo 1). Ainda assim, frente à incerteza devido à falta de dados (principalmente de táxons não neotropicais) do conjunto de dados moleculares, optamos por interpretar o grupo como monofilético, conforme discutido ao longo do trabalho.

A presente análise filogenética de evidência total trouxe novas perspectivas sobre a classificação de Piestinae e suas relações com as demais subfamílias do grupo Oxytelinae (GREBENNIKOV; NEWTON, 2012; MCKENNA et al., 2015; SILVA, 2020). Além disso, a estrutura filogenética encontrada para a linhagem Oxytelinae fortalece a relação evolutiva próxima entre Piestinae e Osoriinae. Com relação específica de Piestinae, a inclusão de caracteres morfológicos de adultos e larvas, junto com os dados moleculares, foi essencial para reforçar a monofilia de Piestinae e sugerir uma nova proposta de relacionamento interno dos gêneros.

A análise de tempo de divergência produziu estimativas amplamente congruentes com estudos anteriores. A recuperação de Staphylinidae com início de divergência no Triássico Tardio (~219,58 Ma) corrobora a hipótese de uma origem e diversificação antiga da família, estando mais alinhada com as estimativas de Beutel et al. (2024) do que com as de Zhang e Zhou (2013).

A linhagem informal Oxytelinae foi datada em aproximadamente 173,30 Ma, indicando uma diferenciação relativamente antiga dentro de Staphylinidae. Entre as subfamílias que compõem essa linhagem, Scaphidiinae apresentou um evento de divergência no Jurássico Tardio (~146,07 Ma), seguido por processos de diversificação ao longo do Cretáceo Inicial. Osoriinae corresponde à segunda subfamília mais antiga, com início de diversificação estimado para o Cretáceo Inicial (~139,02 Ma), enquanto Oxytelinae divergiu posteriormente, por volta de 124,70 Ma. Por fim, Piestinae (desconsiderando *Siagonium* e *Eupiestus*) representa a subfamília mais recente da linhagem, com divergência estimada no Cretáceo Tardio, aproximadamente 97,80 Ma.

Embora Piestinae tenha sido consistentemente recuperada como um grupo parafilético em nossa análise de tempo de divergência, os dois clados identificados, correspondentes aos gêneros neotropicais (*Hypotelus* e *Piestus*) e aos gêneros paleárticos (*Siagonium* e *Eupiestus*), apresentaram estimativas de origem bastante próximas, datando entre 97,80 e 83,81 Ma, ambas no Cretáceo Tardio. Essas estimativas são compatíveis com a idade do fóssil atribuído à subfamília, datado em aproximadamente 99 Ma.

Esses resultados evidenciam que, embora as estimativas de tempo possam variar conforme os métodos e pontos de calibração empregados, os padrões gerais de diversificação sugerem que a linhagem Oxytelina passou por uma irradiação expressiva ao longo do Mesozoico, culminando na notável diversidade observada na família atualmente.

REFERÊNCIAS

- ABOUHEIF, E.; WRAY, G. A. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*, v. 297, n. 5579, p. 249-252, 2002.
- ARRIAGA-VARELA, E.; TOMASZEWSKA, W.; SZAWARYN, K.; ROBERTSON, J.; SEIDEL, M.; ŚLIPÍŃSKI, A.; FIKÁČEK, M. The resurrection of *Cerasommatidiidae*, an enigmatic group of coccinelloid beetles (Coleoptera: Coccinelloidea) based on molecular and morphological evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 197, n. 4, p. 1078–1115, 2023.
- ASGHAR, U.; MALIK, M. F.; ANWAR, F.; JAVED, A.; RAZA, A. DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Advances in Entomology*, v. 3, n. 4, p. 132, 2015.
- BERNHAEUER, M. *Staphylinidae. Coleopterorum Catalogus*, v. 19, p. 1-86, 1910.
- BEUTEL, R. G.; XU, C.; JARZEMBOWSKI, E.; KUNDRATA, R.; BOUDINOT, B. E.; McKENNA, D. D.; GOCZAŁ, J. The evolutionary history of *Coleoptera* (Insecta) in the late Palaeozoic and the Mesozoic. *Systematic Entomology*, v. 49, n. 3, p. 355–388, 2024.
- BORTOLUZZI, S.; CARON, E.; RIBEIRO-COSTA, C. S. Revision and phylogeny of *Hypotelus* Erichson: a Neotropical genus of minute rove beetles (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae). *Zootaxa*, v. 4273, n. 4, p. 451–487, 2017.
- CAI, C. Y.; LÜ, L.; CARON, E.; BORTOLUZZI, S.; NEWTON, A. F.; THAYER, M. K.; HUANG, D. Y. First Piestine rove beetle in Eocene Baltic amber (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 89, n. 4, p. 345–357, 2016.
- CAI, C.; TIHELKA, E.; GIACOMELLI, M.; LAWRENCE, J. F.; ŚLIPÍŃSKI, A.; KUNDRATA, R. et al. Integrated phylogenomics and fossil data illuminate the evolution of beetles. *Royal Society Open Science*, v. 9, n. 3, p. 211771, 2022.

CARON, E.; BUSANELLO, D. G.; BUSS, B. C. Redefining *Siagonium* Kirby & Spence (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae): phylogeny, biogeography and taxonomy. *Insect Systematics & Evolution*, no prelo.

CARON, E.; MCCLARIN, J.; BUSS, B. C.; FOTI, L. Combining molecular and morphological data to test the monophyly of *Hypotelus* Erichson and description of new species from Ecuador (Coleoptera, Staphylinidae, Piestinae). *Zootaxa*, 5631(3), 548-560, 2025.

CARON, E.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; NEWTON, A. F. New position of an abdominal defensive gland complex in Staphylinidae (Coleoptera) with redescription of *Piestus heterocephalus* Fauvel, 1902 (Piestinae). *Zootaxa*, v. 1895, n. 1, p. 1-9, 2008.

CARON, E.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; NEWTON, A. F. Cladistic analysis and revision of *Piestus* Gravenhorst with remarks on related genera (Coleoptera: Staphylinidae: Piestinae). *Invertebrate Systematics*, v. 25, n. 6, p. 490-585, 2012.

CATERINO, M. S.; HUNT, T.; VOGLER, A. P. On the constitution and phylogeny of Staphyliniformia (Insecta: Coleoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 34, n. 3, p. 655-672, 2005.

CHATZIMANOLIS, S.; COHEN, I. M.; SCHOMANN, A.; SOLODOVNIKOV, A. Molecular phylogeny of the mega-diverse rove beetle tribe Staphylinini (Insecta, Coleoptera, Staphylinidae). *Zoologica Scripta*, v. 39, n. 5, p. 436–449, 2010.

CHE, L.-H. et al. Genome-wide survey of nuclear protein-coding markers for beetle phylogenetics and their application in resolving both deep and shallow-level divergences. *Molecular Ecology Resources*, v. 17, n. 6, p. 1342–1358, 2017.

CROWSON, R. A. The evolutionary history of Coleoptera, as documented by fossil and comparative evidence. In: *Atti del X Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, p. 47-90, 1975.

CROWSON, R. A.; ELLIS, I. Observations on *Dendrophagus crenatus* (Paykull) (Cucujidae) and some comparisons with Piestine Staphylinidae (Coleoptera). 1968.

DILLON, N.; AUSTIN, A. D.; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, v. 5, n. 1, p. 21-24, 1996.

DONOGHUE, M. J. et al. The importance of fossils in phylogeny reconstruction. *Annual Review of Ecology and Systematics*, p. 431-460, 1989.

EERNISSE, D. J.; KLUGE, A. G. Taxonomic congruence versus total evidence, and amniote phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, n. 6, p. 1170-1195, 1993.

ERICHSON, W. F. *Genera et species Staphylinorum insectorum coleopterorum familiae*. Paris: FH Morin, 1840.

FARRELL, B. D. "Inordinate Fondness" explained: why are there so many beetles? *Science*, v. 281, n. 5376, p. 555-559, 1998.

FARRELL, B. D.; SEQUEIRA, A. S. Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution*, v. 58, n. 9, p. 1984-2001, 2004.

GAUNT, M. W.; MILES, M. A. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, n. 5, p. 748-761, 2002.

GÓMEZ-ZURITA, J.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E. The evolutionary history of the genus *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) inferred from mitochondrial COII gene and partial 16S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 14, n. 2, p. 304-317, 2000.

GÓMEZ-ZURITA, J. et al. Recalibrated tree of leaf beetles (*Chrysomelidae*) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores. *PLoS One*, v. 2, n. 4, p. e360, 2007.

GRATSHEV, V. G.; ZHERIKHIN, V. V. The fossil record of weevils and related beetle families (Coleoptera, Curculionoidea). *Acta Zoologica Cracoviensia*, v. 46, n. supplement P, p. 129-138, 2003.

GRAVENHORST, J. L. C. *Monographia Coleopterorum Micropterorum*. Gottingae: Henricus Dieterich, p. 248, 1806.

GREBENNIKOV, V. V.; NEWTON, A. F. Good-bye *Scydmaenidae*, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse *Staphylinidae sensu latissimo* (Coleoptera). *European Journal of Entomology*, v. 106, n. 2, p. 275, 2009.

GREBENNIKOV, V.; NEWTON, A. Detecting the basal dichotomies in the monophylum of carrion and rove beetles (*Insecta: Coleoptera: Silphidae* and *Staphylinidae*) with emphasis on the *Oxytelinae* group of subfamilies. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, v. 70, p. 133-165, 2012.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

HANSEN, M. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biol. Skr.*, v. 48, p. 1-339, 1997.

HATCH, M. H. Studies on the *Silphinae*. *Journal of the New York Entomological Society*, v. 35, n. 4, p. 331-371, 1927.

HERMAN, L. H. Catalog of the *Staphylinidae* (*Insecta: Coleoptera*). 1758 to the end of the second millennium. I. Introduction, history, biographical sketches, and omaliine group. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 2001, n. 265, p. 1-659, 2001.

HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, p. 23-42, 1987.

HOANG, D. T. et al. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 2, p. 518-522, 2018.

HUELSENBECK, J. P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, v. 294, n. 5550, p. 2310-2314, 2001.

HUNT, T. et al. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1913-1916, 2007.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KRAATZ, G. *Die Staphylinen-Fauna von Ostindien: insbesondere der Insel Ceylan*. Nicolaische Verlagsbuchhandlung, 1859.

KIRBY, W.; SPENCE, W. *An Introduction to Entomology: or Elements of the Natural History of Insects: with Plates*. Vol. 1. London: Printed for Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown, 1815.

KIREJTSHUK, A. G. et al. Family Lasiosynidae n. fam., new palaeoendemic Mesozoic family from the infraorder Elateriformia (Coleoptera: Polyphaga). *Annales de la Société Entomologique de France*, Paris: Taylor & Francis Group, v. 46, n. 1–2, p. 67–87, 2010.

KIREJTSHUK, A. G. et al. Evolution of the elytral venation and structural adaptations in the oldest Palaeozoic beetles (*Insecta: Coleoptera: Tshekardocoleidae*). *Journal of Systematic Palaeontology*, v. 12, n. 5, p. 575-600, 2014.

LAWRENCE, J. F.; NEWTON, A. F. Evolution and classification of beetles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 13, p. 261-290, 1982.

MADDISON, D. R. et al. Monophyly of terrestrial adephagan beetles as indicated by three nuclear genes (*Coleoptera: Carabidae* and *Trachypachidae*). *Zoologica Scripta*, v. 38, n. 1, p. 43-62, 2009.

MAUS, C.; PESCHKE, K.; DOBLER, S. Phylogeny of the genus *Aleochara* inferred from mitochondrial cytochrome oxidase sequences (*Coleoptera: Staphylinidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 18, n. 2, p. 202-216, 2001.

MCKENNA, D. D. Towards a temporal framework for “Inordinate Fondness”: reconstructing the macroevolutionary history of beetles (*Coleoptera*). *Entomologica Americana*, v. 117, n. 1, p. 28-36, 2011.

MCKENNA, D. D. et al. Phylogeny and evolution of *Staphyliniformia* and *Scarabaeiformia*: forest litter as a stepping stone for diversification of nonphytophagous beetles. *Systematic Entomology*, v. 40, n. 1, p. 35-60, 2015a.

MCKENNA, D. D. et al. The beetle tree of life reveals that *Coleoptera* survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. *Systematic Entomology*, v. 40, n. 4, p. 835-880, 2015b.

MCKENNA, Duane D. et al. The evolution and genomic basis of beetle diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 49, p. 24729-24737, 2019.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, v. 37, n. 5, p. 1530-1534, 2020.

MILLER, K. B.; BERGSTEN, J.; WHITING, M. F. Phylogeny and classification of the tribe *Hydaticini* (Coleoptera: *Dytiscidae*): partition choice for Bayesian analysis with multiple nuclear and mitochondrial protein-coding genes. *Zoologica Scripta*, v. 38, n. 6, p. 591-615, 2009.

NEWTON, A. F.; THAYER, M. K. *Protopselaphinae* new subfamily for *Protopselaphus* new genus from Malaysia, with a phylogenetic analysis and review of the Omaliine Group of *Staphylinidae* including *Pselaphidae* (Coleoptera). In: *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, p. 219-320, 1995.

NEWTON, A. *StaphBase* (version Aug 2022). In: BÁNKI, O.; ROSKOV, Y.; DÖRING, M.; et al. *Catalogue of Life (Annual Checklist 2024)*. Catalogue of Life, Amsterdam, Netherlands. Disponível em: <https://doi.org/10.48580/dg9ld-3gk>. Acesso em: 17 mar. 2025.

DE OLIVEIRA, C. F. M. *Estudos Genético-Moleculares em Populações de Atta sexdens (Hymenoptera: Formicidae): Comparação de Protocolos, Estimativas de Variabilidade e Estrutura Populacional no Sudoeste da Bahia, Brasil*. 2017.

ORLOV, I. et al. Total-evidence backbone phylogeny of *Aleocharinae* (Coleoptera: Staphylinidae). *Cladistics*, v. 37, n. 4, p. 343-374, 2021.

PATTERSON, C. Significance of fossils in determining evolutionary relationships. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 12, p. 195-223, 1981.

PONOMARENKO, A. G. Historical development of *Coleoptera*. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR*, v. 167, p. 1-47, 1983.

PONOMARENKO, A. G. Beetles. *Scarabaeida* (= *Coleoptera*). In: *Nasekomye v rannemelovykh ekosistemakh zapadnoy Mongolii. The Joint Soviet-Mongolian Palaeontological Expedition*, v. 28, p. 84-105, 1986.

PONOMARENKO, A. G. The geological history of beetles. In: *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*, v. 1, p. 155-171, 1995.

PONOMARENKO, A. G. Ecological evolution of beetles (*Insecta: Coleoptera*). *Acta Zoologica Cracoviensia*, v. 46, n. Suppl, p. 319-328, 2003.

PONOMARENKO, A. G. New beetles (*Insecta, Coleoptera*) from the Upper Vyatkian Aristovo locality, European Russia. *Paleontological Journal*, v. 52, p. 620-630, 2018.

PONOMARENKO, A. G. Permian triaplids (*Coleoptera, Triaplidae*), yet another group of Mesozoic beetles from the Terminal Permian. *Paleontological Journal*, v. 55, p. 650-661, 2021.

PONOMARENKO, A. G.; PROKIN, A. A. Review of paleontological data on the evolution of aquatic beetles (*Coleoptera*). *Paleontological Journal*, v. 49, n. 13, p. 1383-1413, 2015.

PRÜSER, F.; MOSSAKOWSKI, D. Low substitution rates in mitochondrial DNA in Mediterranean carabid beetles. *Insect Molecular Biology*, v. 7, n. 2, p. 121-128, 1998.

PYRON, R. A. Post-molecular systematics and the future of phylogenetics. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 30, n. 7, p. 384-389, 2015.

REICHE, L. Étude des espèces de *Mylabrides* de la collection de L. Reiche, suivie d'une note sur le genre *Trigonurus* Mulsant et description d'une espèce nouvelle. In: *Annales de la Société entomologique de France*. 1865. p. 627-642.

ROBERTSON, J. A.; MOORE, W. Phylogeny of *Paussus* L. (*Carabidae: Paussinae*): unravelling morphological convergence associated with myrmecophilous life histories. *Systematic Entomology*, v. 42, n. 1, p. 134-170, 2017.

ROHDENDORF, B. B. The order *Coleoptera*: Coleopterans or beetles. *Paleozoic Insects of the Kuznetsky Basin*, v. 85, p. 412-463, 1961.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RUIZ, C.; JORDAL, B.; SERRANO, J. Molecular phylogeny of the tribe *Sphodrini* (*Coleoptera: Carabidae*) based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 50, n. 1, p. 44-58, 2009.

RYVKIN, A. B. New Cretaceous *Staphylinidae* (*Insecta*) from the Far East. *Paleontological Journal*, v. 4, p. 103-106, 1988.

SAYYARI, E.; MIRARAB, S. Testing for polytomies in phylogenetic species trees using quartet frequencies. *Genes*, v. 9, n. 3, p. 132, 2018.

SHARP, D. The *Staphylinidae* of Japan. *Annals and Magazine of Natural History*, [Part 7], n. 6, p. 319-334, 1889.

SIKES, D.; TRUMBO, S.; PECK, S.. Cryptic diversity in the New World burying beetle fauna: *Nicrophorus hebes* Kirby—new status as a resurrected name (*Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae*). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, v. 74, p. 299-309, 2016.

SIKES, D. S.; THAYER, M. K.; NEWTON, A. F. Large carrion and burying beetles evolved from *Staphylinidae* (*Coleoptera, Staphylinidae, Silphinae*): a review of the evidence. *ZooKeys*, v. 1200, p. 159, 2024.

SILVA, S. B. Filogenia da *Piestinae*: abordagem morfológica e molecular para um problema histórico em *Staphylinidae* (*Coleoptera*). 2020. 120 f. Tese (Doutorado em

Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SMITH, A. B. Parsimony, phylogenetic analysis, and fossils. *Systematics and the Fossil Record*, p. 31-72, 2009.

SMITH, D. M.; MARCOT, J. D. The fossil record and macroevolutionary history of the beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 282, n. 1805, p. 20150060, 2015.

SIMON, C. et al. 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*, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SONNENBERG, R.; NOLTE, A. W.; TAUTZ, D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*, v. 4, p. 1-12, 2007.

STEEL, W. O. Notes on *Staphylinidae*, chiefly from New Zealand. In: *Transactions of the Royal Society of New Zealand*, p. 213-235, 1950.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

THAYER, M. K. et al. 11.7. *Staphylinidae* Latreille, 1802. *TIC*, 2003.

THAYER, M. K. *Staphylinidae* Latreille, 1802. In: BEUTEL, R. G.; KRISTENSEN, N. P. (eds.). *Handbook of Zoology, Vol. IV, Part 38, Coleoptera, Beetles, Vol. 1: Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim)*, 2nd edn. pp. 394–442. Walter de Gruyter, Berlin, 2016.

TIAN, E.; YU, H. A simple and rapid DNA extraction protocol of small insects for PCR amplification. *Entomological News*, v. 123, n. 4, p. 303-310, 2013.

TOUSSAINT, E. F. A. et al. The peril of dating beetles. *Systematic Entomology*, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2017.

WANG, Q.; WANG, X. Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis. *Pakistan Journal of Zoology*, v. 44, n. 2, 2012.

WARD, P. S.; DOWNIE, D. A. The ant subfamily *Pseudomyrmecinae* (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology*, v. 30, n. 2, p. 310-335, 2005.

WIENS, J. J. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology*, v. 53, n. 4, p. 653-661, 2004.

WIENS, J. J.; MORRILL, M. C. Missing data in phylogenetic analysis: reconciling results from simulations and empirical data. *Systematic Biology*, v. 60, n. 5, p. 719-731, 2011.

WILD, A. L.; MADDISON, D. R. Evaluating nuclear protein-coding genes for phylogenetic utility in beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 48, n. 3, p. 877-891, 2008.

WILF, P. Fossil angiosperm leaves: paleobotany's difficult children prove themselves. *The Paleontological Society Papers*, v. 14, p. 319-333, 2008.

YAMAMOTO, S.; CARON, E.; BORTOLUZZI, S. *Propiestus archaicus*, the first Mesozoic amber inclusion of piestine rove beetles and its evolutionary and biogeographical significance (Coleoptera: Staphylinidae: Piestinae). *Journal of Systematic Palaeontology*, v. 17, n. 15, p. 1257-1270, 2019.

YAN, E. V.; BEUTEL, R. G.; PONOMARENKO, A. G. † *Peltosynidae*, a new beetle family from the Middle–Late Triassic of Kyrgyzstan: its affinities with *Polyphaga* (Insecta, Coleoptera) and the groundplan of this megadiverse suborder. *Journal of Systematic Palaeontology*, v. 16, n. 6, p. 515-530, 2018.

YAN, E. V. et al. *Ademosynidae* (Insecta: Coleoptera): A new concept for a coleopteran key taxon and its phylogenetic affinities to the extant suborders. 2017.

YUE, Y. et al. The first fossil species of subfamily *Piestinae* (Coleoptera: Staphylinidae) from the Lower Cretaceous of China. *Cretaceous Research*, v. 63, p. 63-67, 2016.

YUE, Y.; ZHAO, Y.; REN, D. Three new mesozoic staphylinids (*Coleoptera*) from Liaoning, China. *Cretaceous Research*, v. 31, n. 1, p. 61-70, 2010.

YUE, Y.; REN, D.; SOLODOVNIKOV, A. The oldest fossil species of the rove beetle subfamily *Oxyporinae* (*Coleoptera: Staphylinidae*) from the Early Cretaceous (*Yixian Formation*, China) and its phylogenetic significance. *Journal of Systematic Palaeontology*, v. 9, n. 4, p. 467-471, 2011.

ZHANG, S. et al. Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 205, 2018.

ZHANG, D. et al. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular Ecology Resources*, v. 20, n. 1, p. 348-355, 2020.

ZHANG, X.; ZHOU, H. How old are the rove beetles (*Insecta: Coleoptera: Staphylinidae*) and their lineages? Seeking an answer with DNA. *Zoological Science*, v. 30, n. 6, p. 490-501, 2013.

ZHENG, Y.; WIENS, J. J. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 94, p. 537-547, 2016.

HZ, Z. Species and species diversity. *Chinese Biodiversity*, 8, 215–226. In: Chinese with English abstract, 2000.

ŻYŁA, D.; SOLODOVNIKOV, A. Multilocus phylogeny defines a new classification of *Staphylininae* (*Coleoptera, Staphylinidae*), a rove beetle group with high lineage diversity. *Systematic Entomology*, v. 45, n. 1, p. 114-127, 2020.

ŻYŁA, D. et al. Total-evidence analysis resolves the phylogenetic position of an enigmatic group of *Paederinae* rove beetles (*Coleoptera: Staphylinidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 157, p. 107059, 2021.

APENDICE 1. Matriz de dados de caracteres morfológicos de adultos e larvas utilizados para a análise filogenética da subfamília Piestinae (Coleoptera: Staphylinidae).

>Philonthus_sp

1110010001001101110001000000110000110100101110100000000000000011110111100-00
000011011100-0010010--012020-02110101010230100100010-1110000000-000-1111011110
001000--1022--0-01--24010100010110-0000-0000--10200101000111100013200100-002010
10110

>Bledius_hermani

00000110101201011101100001011110101100-000400110002121000010010011010---0-110
00001001011000100101-02101000110-00010-200010000200-1110001100-1011111110100
1010011000211010101003100010100200-0101001100000100120010000-00110110000-00
000121011

>Oxytelus_sp

101101001002100011011000001111110010010010210110002020000000000010011110111
1000001000-11011000121-02000000110-100-0-230110010100-1110001100-1011111101010
01010011010-----

>Lispinus_sp

010100000001211011010110001011101011010001410010000120001111111011011101110
010100011110-011000130111010102111001011212110010201011000012111010-0-0--0-10-
00100???1020011010201102001110101110110-1110101110110100110-02001020000-000
01010011

>Piestus_minutus

0010010110002011111101000010010110111100114100101120211101?10111010112101210
1110011111111111011130122121102110101111230101111201011100010111000-1010-10131
010011000011101011010412001010021101311101010010001120000111101012210101110
211111111

>Piestus_sulcatus

0010110110002011111101000000010111100100114100101120211101010111010112101210
1110011111111111011130112111102110101111230101111201011100010111000-1010-10131
0100110000-----

>Aleochara_sp

010001001100100011000100011110-0000--0-0103110100000021000000001110111100-010
00011011011010100110-002100102110101111212110010000-1111101100-000-1111-111100

020-1100001--0-010210-01000100100-1110-00000010100111000000-02102020000-002001
00010

>Scaphisoma_sp

00000010000000001000100000011101011110100013101000001011000000100100011100-1
1000100011000-01111020-10---000110-11000-00???1010010-00000100011000-1010-100-0
0010011110001010102005121210010200-1100-100000101010---001011011021000010002
00101011

>Eleusis_sp

100000001002201011000012101011000010111011411110002122001000100001010---0-00
010000011000-00100103102202010000-10001121011001120101110101010-000-0-0--1-10-
001000--1011100-111011011010100100-1310-0000001010112001011101101201011111120
0111101

>Nacaeus_sp

0101000010001100110101100011111010110110111110110021200010101010110111100-10
010010000-10-111000131102010102110100011012110011100-01000010110010-0-0--0-10-
001000--11201111001210-10110010100-1300-01100011000120001100-12101010010-0010
0100101

>Thoracophorus_sp

100001001000111011010100001011101011011001211110002000000110011000010---0-100
000001-----0100013212101000210-00000-----1010211111100110111010-0-0--0-10-00100
11010211012111013010110100100-1200-111000110011100101010011120101111112001101
01

>Leptochirus_sp

00111001100221111100020100101110000--0-0110100110021210010101110001111100-110
100001110110101010133102110102112100010200111110210-01100012111010-0-0--0-11-0
01000--11010010110204010010000100-1200-1100001021011000010100200221001101100
0000011

>Eupiestus_sp

101101011001111011010200001001101010010011010110002011100??1010010111000101
0110011100-11110000013212200010211010111121211111111010000112111000-11100101
210001210000-----

>Eupiestus_scupticulis

1111010110011110110102000010011010100100110101100020111011110100101110001010
110011100-11110000013212200010211010111120011111111000000112111000-111001012
10001210000-----

>Hypotelus_sp

100111011001201011010200001001111010010011010110002022111110101110112010-10
 110010100-11111100113112201010211010111120111111101011000001110000-111001012
 10000210000-----

>Hypotelus_pusillus

1101110110011010110102000000011110100100110101100020220111110101110112010-10
 110010100-111111011131122010102110101111200111111101011000001110000-111001012
 100002100001110101111011200101001010121110101011010012000001110201201011111
 1210111101

>Piestus_sp

000011011001211101100300100011010010010011410010112121110101011001011210121
 0111000111111111011130112111102110100111230101111201011100010111000-1010-1013
 101002100000110101101041200101101010121110101001000112000011110101221011111
 0211111101

>Siagonium_sp

01001100100110101101000010101111111010111210011012122010110001011011200121
 0110000111111011101113112212000210-101011211011011201001111011110000-11100101
 210000210000111010110104020010110101012111010101100001200101111010121101111
 11211111111

>Siagonium_vittatum

0100110010002011110100001010111110111101112100110121220101100010110112011210
 110000111111011101113112201011210-101011231111011211001111011110000-1110010121
 0000210000-----

>Prognathoides_mjobergi

1110110110002111110000000010111110100101113110100121210011000010111112001010
 111000011011011101113112210010210-101011231111010201101111011111000-1010-1013
 0000121000011101211110412001001010101211001110110100120000111101001120111111
 200120011

>Piestoneus_oharai

010001001001101101000300101011111111101112100110121220101100010110112001010
 1100000111110111011132122120002111101011231111010201101111011110000-111001012
 10000210000-----

>Hypotelus_chusqueaticus

100111011001101011?102?00010011?10100100110101100020220111110101110112010-10
 110010100-1111110?113112201010211010111120?11111101011000001110000-111001012
 10000210000-----