

Identificación molecular y distribución geográfica de siete especies del género *Charidotella* (Coleoptera: Chrysomelidae) en Panamá

Molecular identification and geographical distribution of seven species of the genus *Charidotella* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Panama

Claudia Elizabeth Toledo-Perdomo¹
toledo.perdomo@gmail.com

Recibido: 02 de julio de 2020, **Aceptado:** 11 de septiembre de 2020

RESUMEN

El género *Charidotella* (Weise, 1896) (Chrysomelidae, Cassidinae), incluye algo más de 100 especies distribuidas desde Canadá hasta el Sur de Argentina. Algunas especies son consideradas plagas agrícolas. Muchas de ellas son sumamente difíciles de distinguir usando caracteres morfológicos. Se evaluó el fragmento correspondiente al código de barras del ADN, del gen citocromo c oxidasa I (COI) en siete especies de *Charidotella* colectadas en cinco sitios de muestreo de Panamá. Las secuencias se analizaron mediante Neighbor Joining, que produce árboles filogenéticos basados en distancias genéticas. Las especies estudiadas fueron *C. ventricosa*, *C. zona*, *C. sexpunctata*, *C. annexa*, *C. sinuata*, *C. ambita*, *C. tumida*. La especie más frecuente en los puntos de colecta fue *Charidotella sexpunctata* y la más cercana a ella según el estudio molecular es *C. sinuata*. Las especies que se encuentra mayormente distribuida en Panamá es *Charidotella sexpunctata*.

Palabras clave: Neotrópico; ADN código de barras; Citocromo oxidasa 1; identificación de especies.

ABSTRACT

The genus *Charidotella* (Weise, 1896) (Chrysomelidae, Cassidinae), includes just over 100 species distributed from Canada to southern Argentina. Some species are considered agricultural pests. Many of them are extremely difficult to distinguish using morphological characters. The DNA barcode fragment, cytochrome c oxidase I (IIC) gene, was evaluated in seven *Charidotella* species collected at five sampling sites in Panama. The sequences were analyzed using Neighbor Joining, which produces phylogenetic trees based on genetic distances. The species studied were *C. ventricosa*, *C. zona*, *C. sexpunctata*, *C. annexa*, *C. sinuata*, *C. ambita*, *C. tumida*. The most common species at collection points was *Charidotella sexpunctata* and the closest to it according to the molecular study is *C. sinuata*. The species that are mostly distributed in Panama is *Charidotella sexpunctata*.

Keywords: Neotropics; DNA barcode; Cytochrome oxidase 1; species identification.

¹ Universidad Rafael Landívar. Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. Escuintla, Guatemala. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2281-3216>

© 2020 - Revista Científica de FAREM-Estelí.



Este trabajo está licenciado bajo una [Licencia Internacional Creative Commons 4.0 Atribución-NoComercial-CompartirIgual](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

INTRODUCCIÓN

Cassidinae es una subfamilia de Chrysomelidae que se encuentra ampliamente distribuida desde Canadá hasta Argentina (Borowiec, 2002). Presenta 6, 319 especies agrupadas en 341 géneros y 36 tribus (Borowiec & Świętojańska, 2014; Chaboo, 2007). Es un grupo muy diverso, principalmente en la región Neotropical. La tribu con mayor número de especies a nivel mundial es Casidini (Lopez-Perez & Zaragoza-Caballero, 2018).

El género *Charidotella* se caracteriza por el cuerpo pequeño, ovalado, dorso convexo, liso, brillante, los élitros son ligeramente más anchos que el pronoto y los ángulos humerales redondeados o agudos. Incluye unas 100 especies agrupadas en 5 subgéneros (Borowiec, 1989; Borowiec & Świętojańska, 2002; Buzzi & Andrade, 2005; Borowiec & Świętojańska, 2015), que se distinguen básicamente por caracteres morfológicos en las uñas tarsales (Borowiec, 1989).

Muchas especies de Cassidini atacan plantas de las familias Convolvulaceae y Asteraceae, como el camote o patata dulce *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae). (Borowiec, 1999; Sultan et al., 2008). Las especies de *Charidotella*, consideradas plagas del camote son *C. sexpunctata*, *C. flaviae* y *C. rubicunda* (Monte, 1932; Maia & Buzzi, 2005). *Charidotella flaviae* y *C. rubicunda* son plagas de *Ipomoea carica* e *Ipomoea batatas* y pueden ocasionar la muerte de las plantas al comienzo del desarrollo del cultivo.

La correcta identificación de una especie plaga es fundamental para establecer estrategias de manejo y control de la misma. Son pocos los estudios que se han realizado del género *Charidotella* y están concentrados en su mayoría en la identificación de nuevas especies y de su comportamiento.

El estudio de la distribución de una especie es una herramienta que aporta información como las preferencias climáticas y ecológicas de la misma. Esta información contribuye también como una herramienta para el establecimiento de planes de control, dentro de un manejo integrado de plagas. Asimismo, es información que puede aportar a futuros estudios en cuanto a la ecología y distribución del género *Charidotella*.

Uno de los géneros más próximos a *Charidotella* es posiblemente *Deloyala* (Chevrolat, 1836). Algunas de las especies de *Charidotella* se separan por diferencias morfológicas sutiles (Borowiec, 2007), razón por la cual los análisis de ADN podrían contribuir a su identificación.

El fragmento del COI constituye una herramienta útil para la identificación de especies conocidas o nuevas especies (Savolainen et al., 2005; Ratnasingham & Herbert, 2007; Mitchell, 2008; Hebert et al., 2003), y aporta información sobre la variabilidad de dichas especies (Hebert et al., 2010).

En este estudio, se evaluó el fragmento correspondiente a los códigos de barras del ADN, del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) en siete especies de *Charidotella* colectados en cinco sitios de Panamá, para evaluar su utilidad en la correcta identificación taxonómica. La identificación de especies por medio del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I, permite la identificación de

especies en corto tiempo, constituyéndose una valiosa herramienta de identificación. También se estudió la distribución geográfica de las especies de *Charidotella* colectadas en Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de las especies

Se seleccionaron cinco puntos de muestreo en Panamá, tomando en cuenta su ubicación geográfica, los cuales fueron debidamente georreferenciados (Tabla 1) donde se colectaron especímenes en forma manual y utilizando una red entomológica. Los especímenes hallados en cada sitio fueron identificados por morfología mediante claves dicotómicas (Tabla 2) y se preservaron en etanol al 95 a -10 °C, hasta la realización de los análisis de ADN. Se secuenciaron además especímenes de *Deloyala* sp., que sirvieron para enraizar el árbol.

Tabla 1. Sitios de colecta establecidos en la presente investigación para los géneros *Charidotella* y *Deloyala* en Panamá.

Lugar de colecta	Provincia	Zona	Coordenadas
Valle Rico	Los Santos	Costa del Pacifico	7°37'31.6"N 80°21'12.3"W
Las Tablas	Los Santos	Costa del Pacifico	7°46'50.2"N 80°16'45.5"W
Chiriquí	Chiriquí	Costa Pacifica	8°24'01.0"N 82°18'52.5"W
Changuinola	Bocas el Toro	Costa del Caribe	9°27'01.4"N 82°30'58.1"W
Gamboa	Panamá	Costa Pacifica	9°07'35.3"N 79°41'38.9"W

Extracción de ADN y Reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizaron 2 individuos por sitio de colecta de las especies pertenecientes a los géneros *Charidotella* y *Deloyala*, que fue empleado para enraizar el árbol. Se trituró el tórax de cada espécimen en 500 µl de una solución buffer CTAB y se agregó 5 µl de 20 µg/µl de proteinasa K. Se incubó a 65 °C por 1.5 horas, invirtiendo la muestra a intervalos de 20 minutos. Seguidamente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionó 15 µl de 50 µg/µl Rnase A, se colocaron en una incubadora a 37 °C por 2 horas, invirtiéndolas a intervalos de 20 minutos. El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura del laboratorio. El sobrenadante se extrajo de cada muestra, con un volumen uniforme de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) por centrifugación a 14,000 rpm por 20 min para la separación de fases. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y el paso del cloroformo alcohol isoamilico dos veces. Se adicionó en la fase acuosa isopropanol frío y se incubó a 4 °C por 2 horas.

El precipitado fue colectado por centrifugación a 14,000 rpm a 4 °C por 30 min, se enjuagó con etanol al 100% y al 70% (-20°C), respectivamente. Posteriormente, el precipitado se lavó y se

removió el etanol, el concentrado (pellet) que se formó del DNA fue secado al aire, se dejó reposar durante toda la noche en 50 µl de solución buffer 1X TE (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0.1 mM EDTA).

Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se siguió a metodología propuesta por Hebert et al., (2003) (DNA barcoding), usando los cebadores LCO1490 (59-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-39) y HCO2198 (59-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-39), para el fragmento de 658 pb, correspondiente al código de barras del gen COI. Las reacciones de PCR fueron conducidas en una mezcla de 20 µl conteniendo 1 µg de DNA extraído previamente, 2 µl de la solución buffer II 10X PCR; 0.2µl de AmpliTaq; 1dNTP's de 8mm; 1 µl de cada cebador; 2 µl MgCl₂ 0.8 µl de DMSO y agua doblemente destilada. El perfil de temperatura fue: 94°C por 1 min, cinco ciclos de 1 min a 94°C, 1.5 min a 45°C y 1.5 min a 72°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1.5 min a 50°C y finalmente un ciclo de 5 min a 72°C.

El producto de la PCR se colocó en un gel de "Low Melting temperature agarose" a una concentración de 1.2% identificar las bandas, se llevó a una temperatura a 70°C por 5 min, luego se colocó a 45°C, por 15 min, se le agregó a cada tubo 1.2 µl de gelasa, y se dejaron a una temperatura de 45°C.

Secuenciación en ciclo

La secuenciación en ciclo se realizó tomando como base los protocolos de Lessios et al., (1996):

2µl de agua doble destilada, 3µl de buffer BD 5X, 1µl del primer "F"/"R", 1 µl de big dye y 3µl de la banda cortada y tratada con gelasa. Luego se centrifugó por 30 segundos. Después se llevó al termociclador PTC-200 utilizando el siguiente programa: temperatura inicial de 96 °C por un min, luego una temperatura de 96 °C por 10 segundos, seguido de una temperatura de 50 °C por 5 segundos, luego a 60 °C por 4 min, y finalmente 24 ciclos desde el segundo paso. Al terminar este proceso se le agregó a cada uno, 10 µl de agua doblemente destilada.

Se prepararon las columnas con Sephadex G-50. A los tubos secos se les agregó 10 µl de diformamida y se corrieron las secuencias en una secuenciadora, con una lectura del fragmento del 98.5% de exactitud.

Procesamiento y análisis de los datos

El árbol de Neighbor Joining (NJ) empleado para el análisis molecular, se realizó mediante PAUP*4.0b 10 y fue enraizado mediante *Deloyala* sp. por ser el género más próximo a *Charidotella*. El soporte de las ramas se evaluó mediante bootstrap.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis molecular incluye siete especies del género *Charidotella*, colectadas en cinco sitios distintos en Panamá (Tabla 1) formando el árbol de NJ obtenido se muestra en la figura 1.

Se obtuvo el dendrograma (Figura 1) de las secuencias de cada muestra procesada, donde demuestra que la especie *C. ventricosa* es la más cercana a la base. Dentro del grupo de especímenes de *C. ventricosa* se encuentra *C. tumida*, lo cual hace pensar o que ese espécimen fue mal identificado y que pertenece a *C. ventricosa*, o que estas especies no se diferencian en base a COI. Le siguen en secuencia evolutiva las especies *C. zona*, *C. ambita*, *C. annexa*, *C. sinuata* y *C. sexpunctata*. La única relación interespecífica bien soportada (82% bootstrap) es la que agrupa las últimas tres especies. Los dos individuos de cada especie estudiada son idénticos (100% bootstrap) al igual que el grupo que incluye a *C. ventricosa* y *C. tumida*.

En las especies representadas en más de un sitio (*C. ventricosa*, *C. sinuata* y *C. sexpunctata*) no se observa mayor variabilidad genética entre sitios.

Los análisis realizados demuestran la formación de 6 grupos, el primero evidencia que las especies *C. tumida*, procedente de Changuinola y *C. ventricosa*, procedentes de Chiriquí y Valle Rico, presentan una cercana relación genética. Los siguientes cuatro grupos están formados por una sola especie cada uno, los cuales son: el primero por *C. zona*, procedente de Valle Rico, el segundo por *C. ambita*, procedente de Changuinola, el tercero por *C. annexa*, procedente de Las Tablas y el cuarto por *C. sinuata*, procedentes de Chiriquí y Changuinola.

El último grupo del árbol filogenético está formado por la especie *C. sexpunctata*, las cuales son procedentes de 3 sitios distintos en Panamá: Gamboa, Valle Rico y Las Tablas. Todos los grupos del dendrograma presentaron un soporte Bayesiano de 100 (Fig. 1). Las especies que genéticamente están más cercanas a *C. sexpunctata* son *C. sinuata*, seguida de *C. annexa*.

En cuanto a la distribución de las especies en Panamá (Tabla 2), la especie que obtuvo mayor número de colectas fue *C. sexpunctata*, la cual también evidenció mayor desplazamiento en el territorio panameño, según los puntos de colecta (Gamboa, Chiriquí y Valle Rico). Esta especie también ha sido reportada como una de las especies del género *Charidotella* que está más ampliamente distribuida en el continente americano (Tabla 3).

Las especies *C. sinuata* fueron colectadas en dos puntos distintos, Chiriquí y Changuinola, los cuales están separados geográficamente por la cordillera Central, los especímenes de estas especies no presentaron diferencias moleculares entre ellas.

La especie que se encontró en un solo sitio de colecta fue *C. annexa*, en Las Tablas, provincia de Los Santos, a pesar que este sitio es el más cercano a Valle Rico, también provincia de Los Santos, donde se encontraron las especies *C. ventricosa*, *C. zona* y *C. sexpunctata*.

C. ventricosa, también fue localizada en Gamboa, provincia de Panamá y *C. tumida*, fue encontrada únicamente en Changuinola, provincia de Bocas del Toro, esta provincia colinda con Costa Rica.

Tabla 2. Especies por sitios de colecta de los géneros *Charidotella* y *Deloyala* en Panamá.

No.	Lugar de colecta	Provincia	Zona	Género	Especie
1.	Valle Rico	Los Santos	Costa Pacifico	<i>Charidotella</i>	<i>C. ventricosa</i>
					<i>C. zona</i>
					<i>C. sexpunctata</i>
2.	Las Tablas Chiriquí	Los Santos	Costa Pacifico	<i>Charidotella</i>	<i>C. annexa</i>
					Chiriquí
		4.	Changuinola	Bocas del Toro	Costa del Caribe
<i>C. sinuata</i>					
<i>C. tumida</i>					
5.	Gamboa	Panamá	Costa Pacifico	<i>Deloyala</i>	<i>D. sp.</i>
				<i>Charidotella</i>	<i>C. ventricosa</i> <i>C. sexpunctata</i>

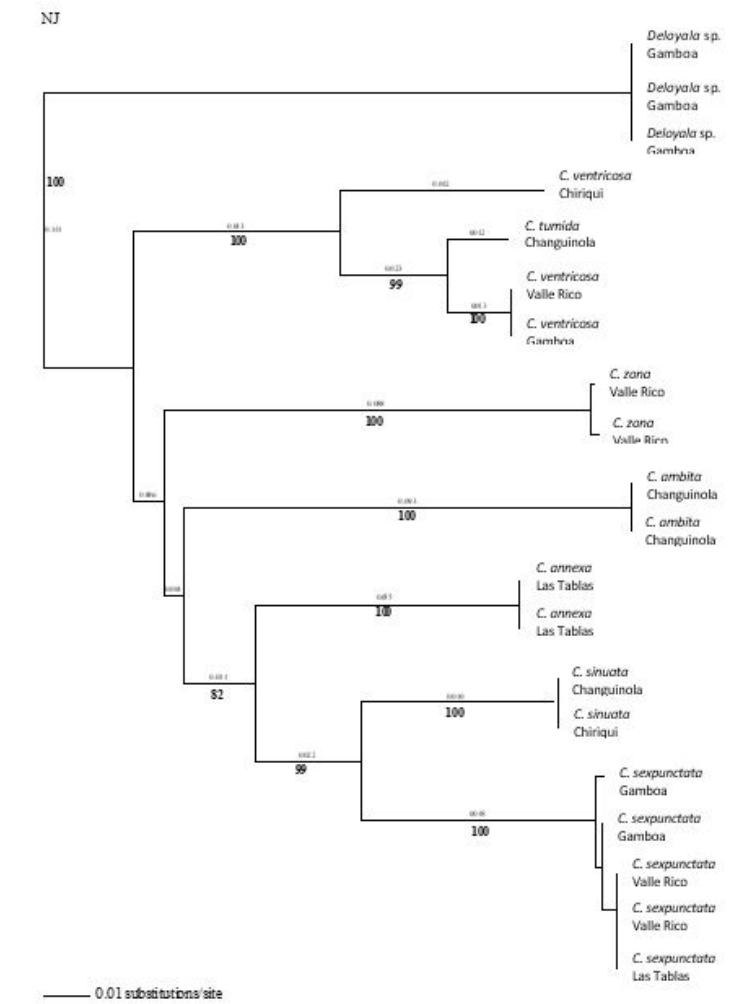


Fig. 1. Dendrograma (Neighbor Joining) de siete especies de *Charidotella* de Panamá, basado en el fragmento de código de barras del ADN de COI. Los valores de bootstrap están indicados debajo de las ramas.

Tabla 3. Recopilación de reportes de las siete especies estudiadas del género *Charidotella* en América.

Especies	Distribución por país	Reportado
<i>Charidotella sexpunctata</i> (Fabricius, 1781)	Desde Canadá hasta Argentina y Brasil	Borowiec, & Świętojańska (2015); Borowiec (2002) Borowiec, & Świętojańska (2018); Chaboo (2003)
<i>Charidotella annexa</i> (Boheman, 1855)	Belice, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Bolivia, Costa Rica	Borowiec (2002) Borowiec, & Świętojańska (2018); Chaboo (2003)
<i>Charidotella sinuata</i> (Champion, 1894)	Costa Rica, Nicaragua, Panamá	Borowiec (2002)
<i>Charidotella ventricosa</i> (Boheman, 1855)	Costa Rica, Venezuela, Belice, Colombia, Guatemala, México, Panamá, Trinidad y Tobago	Borowiec (2002) Borowiec, & Świętojańska (2018)
<i>Charidotella zona</i> (Fabricius, 1801)	Brasil, Costa Rica, Ecuador, Guyana Francesa, Surinam, Venezuela, Bolivia, Guyana, Nicaragua, Panamá, Perú, Trinidad y Tobago, Venezuela, Surinam	Borowiec (2002) Sekerka, & Borowiec (2015)
<i>Charidotella tumida</i> (Champion, 1894)	Costa Rica, Panamá	Borowiec, & Świętojańska (2018)
<i>Charidotella ambita</i> (Champion, 1894)	Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Costa Rica	Borowiec, & Świętojańska (2018)

En cuanto al estudio molecular en *C. sexpunctata* recolectada en 5 sitios en el territorio panameño, demuestra que esta especie no ha presentado cambios genéticos considerables a nivel del gen COI, como lo demuestra el dendrograma Neighbor Joining (NJ), así también ha sido observado morfológicamente. Los mismos aspectos se pudieron identificar en las otras especies de *Charidotella* que fueron analizadas, indicando que las diferencias altitudinales, la presencia de barreras físicas como la Cordillera Central en Panamá, no han tenido un efecto a nivel molecular en las especies del género *Charidotella* en Panamá, demostrando un posible flujo de genes.

Otros estudios realizados han identificado dos nuevas especies del género *Charidotella*, *Charidotella moraguesi* procedente de Guyana Francesa y *Charidotella pacata* procedente de Bolivia y Brasil, las cuales estaban morfológicamente muy cercanas a *C. sexpunctata*, y una de ellas también tenía caracteres morfológicos en común con *C. zona* (Borowiec, 2007) y que en algún momento fueron identificadas con una misma especie.

La similitud morfológica entre *C. sexpunctata* y *C. sinuata*, mencionada por Borowiec (2007), se corrobora también sobre la base de los datos moleculares aquí obtenidos.

En estudios anteriores realizados por Borowiec (2007), indican que existen caracteres morfológicos cercanos entre *C. sexpunctata* y *C. sinuata*. Ubicando a ambas especies dentro del grupo de *Charidotella sexpunctata*. En los resultados de la presente investigación se puede observar en

el dendrograma que la especie molecularmente más cercana a *C. sexpunctata* a nivel del gen mitocondrial COI es *C. sinuata*. Estos resultados permitirán una rápida identificación entre ambas especies por medio de métodos moleculares. A nivel de género y familia también se está haciendo un aporte para esta región mitocondrial, tomando en cuenta que aún hay estudios que reportan la necesidad de seguir investigando la sistemática de la familia Cassidinae, como varios especialistas lo han venido realizando (López-Pérez, 2017).

Con estos estudios moleculares se aporta información de las siete especies colectadas en Panamá, contribuyendo a su descripción molecular, la cual podría permitir aclarar dudas de los especímenes que a nivel morfológico no se pueden clasificar con precisión, obteniendo así una clasificación taxonómica correcta y comprobar la existencia de especies crípticas.

A pesar que en Panamá no se presentó una diversificación de especies en poblaciones geográficas de *Charidotella* colectadas en Panamá, aún podría presentarse este comportamiento en una región más amplia, como lo es el continente americano, principalmente la especie *C. sexpunctata*, debido a que esta especie está ampliamente distribuida en dicho continente. Estudios de todo el continente podrían ayudar a comprender los procesos biogeográficos de la especie.

Otro factor ecológico importante es la relación de *Charidotella* con las plantas hospederas. En los primeros reportes fueron relacionando a *Charidotella* con el género *Ipomoea* (Convolvulaceae) por Rausher, (1983) y Rausher, (1984); así también, los estudios de la influencia de los herbívoros en la diversidad de las plantas hospederas (Rausher & Simms, 1989). Se ha reportado que la tribu Cassidini vive principalmente en plantas pertenecientes a la familia taxonómicas Convolvulaceae (59.1%) seguido de las familias Solanaceae y Asteraceae (31.8% y 15.9% respectivamente) (Buzzi, 1994).

En estudios realizados de la tribu cassidini en México, el género *Charidotella* es el que se ha encontrado mayormente distribuido en todo el país (López- Pérez & Zaragoza-Caballero, 2018). La distribución de *C. sexpunctata* en varios sitios de Panamá, es coincidente con la amplia distribución geográfica de esta especie, desde el norte de Canadá al norte de Argentina, incluyendo Brasil (Borowiec, 2002) lo cual indicaría una mayor capacidad de adaptación a diferentes ambientes de la Región Neártica y de la Región Neotropical.

Estudios realizados en Colombia indican que *C. sexpunctata* ha sido identificada en las regiones de Cundinamarca, Huila, Meta, Santander, Tolima, Valle del Cauca (Borowiec & Świętojańska, 2015). Chaboo (2003), también reporta a *C. sexpunctata* ampliamente distribuida en Costa Rica, con más sitios identificados en comparación con otras especies de *Charidotella*.

Dentro de la clasificación biogeográfica mundial por Morrone (2015), las siete especies estudiadas y colectadas en Panamá se encuentran distribuidas de la siguiente manera: *Charidotella ventricosa* y *Charidotella annexa* se han identificado en el neotrópico y zona de transición mexicana, *Charidotella tumida*, *Charidotella zona*, *Charidotella ambita* y *Charidotella sinuata* han sido registradas en la región del neotrópico, finalmente *Charidotella sexpunctata* en las regiones neártica, zona de transición mexicana y neotrópico. Esto podría indicar que *Charidotella sexpunctata* ha presentado

en el transcurso del tiempo mayor capacidad de adaptación a diferentes regiones climáticas, logrando colonizar tres regiones biogeográficas distintas en el continente americano.

CONCLUSIONES

El género *Charidotella* es un grupo poco estudiado, principalmente desde el punto de vista agrícola. El estudio aporta información molecular del gen COI de las especies de estudiadas del género *Charidotella*, contribuyendo en su rápida identificación a nivel molecular. Región que puede ser empleada en otros estudios moleculares o filogenéticos del género *Charidotella* o de la familia Cassidinae.

Con una rápida identificación de las especies estudiadas, a su vez permitirá el establecimiento de manejo adecuado de poblaciones de las especies que se encuentren como plagas en la producción agrícola.

Las especies que se encuentra mayormente distribuida en Panamá es *Charidotella sexpunctata*. Según los estudios moleculares realizados, la especie molecularmente más cercana a *Charidotella sexpunctata* de la región COI es *Charidotella sinuata*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borowiec, L. (1989). Three new species of *Charidotella* Weise (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae), with checklist of the genus. *Polskie Pismo Entomologiczne*, 59, 203–222.
- Borowiec, L. A. (2002). New records of Neotropical Cassidinae, with description of three new species (Coleoptera: Chrysomelidae). *International Journal of Invertebrate Taxonomy – Genus*, 13(1), 43–138.
- Borowiec, L. A. (1999). world catalogue of the Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologica Silesiae*: Wrocław 476 pp.
- Borowiec, L., & Świętojańska, J. (2014). Cassidinae Gyllenhal, 1813. (pp. 198-217). In: Leschen R.A.B. & R.G. Beutel (Eds.). *Handbook of Zoology, Arthropoda, Insecta, Coleoptera, Beetles. Vol. 3, Morphology and Systematics (Phytophaga)*. De Gruyter, Berlin/Boston.
- Borowiec, L., & Świętojańska, J. (2015). Checklist of tortoise beetles (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae) from Colombia with new data and description of a new species. *ZooKeys*, 518, 87–127. doi: 10.3897/zookeys.518.9350
- Borowiec, L., & Świętojańska, J. (2018). Cassidinae of the world - an interactive manual (Coleoptera: Chrysomelidae). Recuperado de: <http://www.cassidae.uni.wroc.pl/katalog%20internetowy/charidotella.htm>
- Buzzi, Z. J., & Andrade, O. (2005). Uma nova espécie de *Charidotella*, Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), 571-572.
- Buzzi, Z. J. (1994). Host plants of Neotropical Cassidinae. In: Jolivet P.H., Cox M.L., Petitpierre E. (eds) *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae. Series Entomologica*, 50, 205-212.
- Chaboo, C.S. (2003). Tortoise beetles from Costa Rica: new records and localities (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). *Genus*, 14(1), 109–120.
- Chaboo, C.S. (2007). Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal sensu lato (Tortoise

- and leafmining beetle) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 305, 1-250.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert, P. D. N., deWaard, J. R., & Landry, J. (2010). DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, 6, 359–362. doi:10.1098/rsbl.2009.0848
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Wellington, G.M. & Graybeal, A. (1996). Indo-Pacific echinoids in the tropical Eastern Pacific. *Coral Reefs*, 15, 133-142. doi:10.1007/BF01771904
- López-Pérez, S. (2017). Aspectos sistemáticos y biológicos de Cassidinae Gyllenhal, 1813 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Dugesiana*, 24(1), 35-46.
- Lopez-Perez, S. & Zaragoza-Caballero, S. (2018). Cassidini sensu lato (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89,604-673. doi: 10.22201/ib.20078706e.2018.3.2511
- Maia, O.M.A., & Buzzi, Z.J. (2005). Uma nova espécie de *Charidotella* Weise de Curitiba, Paraná, Brasil (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), 571-572.
- Mitchell, A. (2008). DNA barcoding demystified. *Australian Journal of Entomology*, 47, 169–173. doi:10.1111/j.1440-6055.2008.00645.x
- Monte, O. (1932). Alguns Cassidideos, praga da batata doce. *Boletim de Agricultura Zootecnica e veterinaria*, 5, 43–46.
- Morrone, J. J. (2015). Biogeographical regionalisation of the world: a reappraisal. *Australian Systematic Botany*, 28, 81–90. doi: 10.1071/SB14042
- Ratnasingham, S., & Herbert, P. (2007). BOLD: Barcode of life data system. University of Guelph <http://www.boldsystems.org/views/login.php>.
- Rausher, M.D. (1983). Conditioning and genetic variation as causes of individual variation in the oviposition behavior of the tortoise beetle, *Deloyala guttata*. *Animal Behaviour*, 31,743–747.
- Rausher, M.D. (1984). Tradeoffs in performance on different hosts: evidence from within and between site variation in the beetle, *Deloyala guttata*. *Evolution*, 38, 582–595.
- Rausher, M.D., & Simms, E.L. (1989). The evolution of resistance to herbivory in *Ipomoea purpurea*. I. Attempts to detect stabilizingselection. *Evolution*, 43, 563–572.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1805–1811. doi:10.1098/rstb.2005.1730
- Sekerka, L., & Borowiec, L. (2015). Subgenera of *Charidotella* Weise with description of a new subgenus and species from Brazil (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae, Cassidini). *ZooKeys*, 506, 61-74. doi: 10.3897/zookeys.506.8770
- Sultan, A., Borowiec L., Rafi, A., Ilyas, M., Naz, F., & Shehzad, A. (2008). Tortoise beetles of Rawalpindi-Islamabad, Pakistan and their host preferences (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). *Genus*, 19(1), 93–102.