

ANTONIA FIGUEIRA VAN DE KOKEN

EVOLUÇÃO MOLECULAR EM ODONATA: COMPORTAMENTO DE
POUSO EM ZYGOPTERA E TEMPO DE DIVERGÊNCIA EM
LIBELLULIDAE (EIPROCTA)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

K79e
2010

Koken, Antonia Figueira Van de, 1983-
Evolução molecular em Odonata : comportamento de
pouso em Zygoptera e tempo de divergência em Libellulidae
(Epicrocta) / Antonia Figueira Van de Koken. – Viçosa,
MG, 2010.
xiii, 72p. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: p. 67-72.

1. Genética animal. 2. Evolução (Biologia). 3. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 591.35

ANTONIA FIGUEIRA VAN DE KOKEN

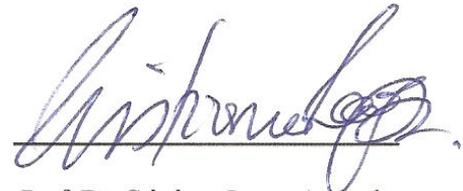
EVOLUÇÃO MOLECULAR EM ODONATA: COMPORTAMENTO DE
POUSO EM ZYGOPTERA E TEMPO DE DIVERGÊNCIA EM
LIBELLULIDAE (EPIPROCTA)

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

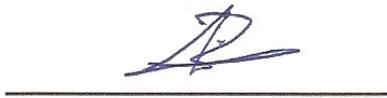
APROVADA: 08 de fevereiro de 2010.



Prof. Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti



Prof. Dr. Cristiano Lopes Andrade



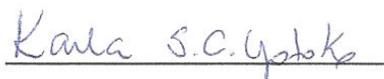
Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos

Co-orientador



Profa. Dra. Daniela Chaves Resende

Co-orientadora



Profa. Dra. Karla Suemy Clemente Yotoko

Orientadora

“Se a princípio a idéia não é absurda, então não há esperança para ela”.

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e à FAPEMIG, que proporcionaram a infra-estrutura e o apoio financeiro, necessários para execução do projeto.

Agradeço à minha orientadora Karla, pela enorme paciência com minhas inúmeras dúvidas, por seu vasto conhecimento em biologia, pela confiança e pela boa convivência. Sem a sua ajuda o trabalho não seria o mesmo. Sua opinião é valiosa para mim.

À Professora Sílvia Pompolo, que me aceitou no programa e confiou em meu trabalho, sem sua bondade eu não teria a chance de entrar no curso.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, que me ajudaram em todos os procedimentos e a quem eu recorria nas horas de pânico e aflição. À professora Tânia, que me ajudou diversas vezes e me permitiu utilizar o laboratório.

Aos odonatólogos, pela ajuda bibliográfica e teórica do capítulo um, Geovanni Ribeiro Loiola, Jhon Trueman, Dennis Paulson, Klaus Reinhardt, Rosser Garrison, e em especial Frederico Lencioni. Aos odonatólogos que me ajudaram no capítulo dois, Karina Furieri, Daniela Resende, Jhon Trueman, Mike May e Jessica Ware, em especial à Karina e Daniela pela identificação das espécies desse capítulo.

Ao amigo e professor Rodrigo Lemes Martins, que me orientou na graduação com libélulas, mesmo não sendo odonólogo, e me ensinou a pensar em biologia, comportamento e evolução.

Algumas pessoas da UFV tiveram papel essencial nessa jornada, Carlinhos e Rita do trailer, sempre amigáveis, Miriam, que me ajudava com toda a parte burocrática do Programa, e que sempre me transmitia paz e luz, os professores que me deram aula, por todo conhecimento e sabedoria, em especial Paulo Fiúza, pelos “choques” que eu levava. À Duka, que me alegrava em qualquer momento do dia.

Aos amigos, vocês foram a emoção durante minha estadia por essa cidade fria e calculista. Às meninas da minha república, pela amizade e pelo aprendizado, em especial Luíza, que me recebeu e acolheu aqui em Viçosa, sempre com muito amor e sinceridade, da mesma forma Alex, que, aliás, formam uma dupla única. À Raquel pela amizade, aos trancos e barrancos aprendi muito convivendo com você. À Sílvia e Claudinei pela amizade desde taxonomia – *the best of*. Ao Marcelo, pela amizade de irmão e pelos inúmeros conselhos em diversas áreas. E todas as outras pessoas envolvidas nessa folia que era quando nos reuníamos, com direito a violão, pandeiro e tamborim, lembrando que a música nos faz pessoas melhores.

Ao amor Luiz Gustavo, que foi meu maior apoio, não me deixou sair correndo de Viçosa e me fez crescer como profissional e como pessoa. Você é a parte principal do alicerce, a ponta do iceberg, a asa da libélula, o olho do furacão, o que houve de mais importante para mim nessa cidade e o que há de mais importante para a minha vida, junto com minha família. Minha vida tomou um novo sentido depois que você surgiu no meu caminho! E sei que ainda teremos muitos caminhos pela frente, sempre juntos, fortes e para o que der e vier. Assim seja. Eu te amo muito.

Aos meus pais e familiares, que acreditaram em mim e me deram força para mais essa etapa da minha vida. Apesar dos dias em que a saudade batia forte, eu sabia que estavam todos me esperando, sempre de braços abertos, independente de qualquer coisa, pois família é assim, e essa família é muito unida! Brigam por qualquer razão, mas acabam pedindo perdão. Amo todos vocês. Aos meus sogros, que me acolheram em suas vidas, assim como toda a sua família, sempre me tratando como uma filha. A nossa convivência é muito especial. Também amo vocês.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Antonia Figueira Van de Koken, nascida às 20 horas e 20 minutos do dia 19 de Dezembro de 1983, em Vitória, “cidade sol com o céu sempre azul”, estado do Espírito Santo. Filha de João Luiz Van de Koken e Margareth Leite Figueira.

Prestou vestibular para direito, pois é uma tradição na família, mas sabia que não era esse o seu caminho e optou por estudar a vida: graduou em Ciências Biológicas, e sua iniciação científica foi com ecologia e comportamento de Odonata – “eu vi libélulas a voar”.

Com o término da graduação, houve um período de aprendizado em outra área, a botânica. Foi em seu período trabalhando na Secretaria Municipal de Meio Ambiente, no setor de arborização.

Com um convite, novos campos foram abertos, e eis que surgia a Biologia Molecular em seu caminho. O mestrado com filogenia molecular! Um grande desafio, pois tudo era novo, tudo a ser descoberto ainda, porém nunca se deve negar um desafio, por maior que ele seja. E ainda trabalhando com árvores! Benditas sejam as árvores!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Aspectos Gerais da Ordem Odonata	1
Objetivos	5
Métodos Filogenéticos	5
Métodos Comparativos.....	11
Relógio Molecular	16
CAPÍTULO 1-Evolução do comportamento de pouso em Zygoptera	19
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	25
Espécies Estudadas.....	25
Análise das Sequências e Construção de Hipóteses Filogenéticas	25
O Monofiletismo de Zygoptera.....	26
Reconstrução do Estado Ancestral e Análise Comparativa.....	26
Resultados	29
Inferência Filogenética.....	29
Reconstrução de Ancestral e Análise Comparativa	30
Discussão	36
Inércia Filogenética.....	36
Novas hipóteses a serem testadas.....	37
<i>Asas Abertas Permitem Respostas Rápidas?</i>	37
<i>O Indivíduo Fica Menos Evidente com Asas Fechadas?</i>	38
<i>Respostas Rápidas e Comportamento Críptico</i>	39
CAPÍTULO 2 – Filogenia e Evolução de Libellulidae (Odonata) baseada em fragmentos de DNA mitocondrial	41
Introdução.....	41
Histórico taxonômico de Odonata.....	42
Relações filogenéticas dentro de Libellulidae.....	44
Material e Métodos.....	46
Coleta do material biológico	46

Escolha da sequência gênica	46
Extração do DNA	47
Amplificação do DNA	48
Sequenciamento do DNA.....	52
Alinhamento do DNA	53
Análises filogenéticas.....	53
Estimativa do tempo de divergência entre as espécies.....	54
Resultados	55
Análises filogenéticas.....	55
Estimativa do tempo de divergência entre as espécies.....	57
Discussão	59
Agrupamento de espécies dentro da família Libellulidae	59
Datas de divergência dentro de Libellulidae.....	61
CONCLUSÕES GERAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros a serem estimados pelo modelo independente, onde os caracteres x e y se modificam entre os dois estados possíveis de maneira independente. A tabela pode representar o caráter x ou y .	13
Tabela 2: Parâmetros a serem estimados pelo modelo dependente, onde os caracteres x e y se modificam entre os dois estados possíveis de maneira dependente. Na determinação dos estados, o número à direita se refere ao caráter x e o número à esquerda se refere ao caráter y .	13
Tabela 3: Sequências das espécies utilizadas, obtidas no <i>GenBank</i> , indicando família, modo de pouso, tipo de forrageio e número de acesso. Os dados comportamentais foram retirados de Paulson (2004).	27
Tabela 4: Modelo Dependente, apresentando as taxas de transições entre os estados dos caracteres, onde q_{12} : $x(0 \rightarrow 0)$, $y(0 \rightarrow 1)$; q_{13} : $x(0 \rightarrow 1)$, $y(0 \rightarrow 0)$; q_{21} : $x(0 \rightarrow 0)$, $y(1 \rightarrow 0)$; q_{24} : $x(0 \rightarrow 1)$, $y(1 \rightarrow 1)$; q_{31} : $x(1 \rightarrow 0)$, $y(0 \rightarrow 0)$; q_{34} : $x(1 \rightarrow 1)$, $y(0 \rightarrow 1)$; q_{42} : $x(1 \rightarrow 0)$, $y(1 \rightarrow 1)$ e q_{43} : $x(1 \rightarrow 1)$, $y(1 \rightarrow 0)$. As taxas onde as mudanças foram simultâneas não foram consideradas. $x = 0$ (pouso com asas fechadas), $x = 1$ (pouso com asas abertas), $y = 0$ (<i>gleaner</i>), $y = 1$ (<i>sallier</i>).	28
Tabela 5: Teste de hipóteses, apresentando os pressupostos, os modelos e os valores do <i>Bayes Factors</i> encontrados.	35
Tabela 6: Espécies coletadas, utilizadas no presente trabalho, e suas respectivas subfamílias e localidades em que foram coletadas.	49
Tabela 7: Sequências da região rRNA 12S-16S disponíveis no <i>GenBank</i> de diferentes espécies e seus respectivos números de acesso.	50
Tabela 8: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação e seqüenciamento do fragmento.....	52
Tabela 9: Concentrações e volumes (em μl) dos reagentes utilizados nas soluções básicas MIX C e F, utilizadas na amplificação do 12S-16S mitocondrial em diferentes espécies.....	52
Tabela 10: Datações de fósseis utilizadas para a calibração das divergências entre os nós. MAA – milhões de anos atrás.....	55
Tabela 11: Valores de estimativas de divergência entre cada ramo, obtidos pelo programa BEAST. Os nós estão representados na figura 18. MAA – Milhões de anos atrás.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Acasalamento de *Heteragrion consors*, mostrando uma sequência de comportamentos: a) tandem pré-copulatório, b) convite à cópula, c) toque genital, d) cópula. Retirado de Loiola (2005). 1
- Figura 2:** Diversidade de Odonata por região biogeográfica. Os números representam número de espécies / número de gêneros. PA – Paleártico; NA – Neártico; NT – Neotropical; AT – Afrotropical; OL – Oriental; AU – Australasiano; PAC – Ilhas do Oceano Pacífico; ANT – Antártica. Retirado de Kalkman *et al.* (2008). 3
- Figura 3:** A anisóptera *Perithemis* sp. e a zigoptera *Hetaerina* sp. Fotos: Luiz Gustavo Souto Soares..... 3
- Figura 4:** Representação de valores relativos de verossimilhança. O eixo Y representa valores crescentes de Verossimilhança. Dois ótimos locais (picos à direita e à esquerda) e um ótimo global (pico maior ao centro). 10
- Figura 5:** Árvore hipotética, na qual foram mapeados os estados atuais de dois caracteres, *x* e *y* (representados por seus estados 0 ou 1 nos nós A a H) e inferidos os estados ancestrais destes mesmos caracteres, que foram mapeados nos nós ancestrais (I a O). 12
- Figura 6:** Transições entre estados de caracteres no modelo A) independente e B) dependente. Modificado de Pagel (2004)..... 14
- Figura 7:** Esquemas simplificados de trabalhos que apresentam a subordem Zygoptera como um grupo parafilético. 20
- Figura 8:** Esquemas simplificados de trabalhos que apresentam a subordem Zygoptera como um grupo monofilético..... 20
- Figura 9:** Árvore filogenética obtida a partir da Análise *Bayesiana*. Os valores ao lado dos nós da árvore correspondem à probabilidade posterior. Os números dentro dos quadrados nos nós internos são os identificadores de cada nó. Quadrados e círculos coloridos ao lado de cada espécie e cada nó correspondem aos estados do comportamento de pouso e forrageio, respectivamente. O asterisco ao lado de um quadrado ou círculo indica que a verossimilhança de um estado é significativamente maior que o do outro. Quadrado verde: pouso com asas fechadas, quadrado vermelho: pouso com asas abertas. Círculo verde: comportamento de forrageio *gleaner*, círculo vermelho: comportamento de forrageio do tipo *sallier*, círculo branco: comportamento de forrageio desconhecido. 32

- Figura 10:** Distribuição das probabilidades posteriores da inferência ancestral dos nós internos da árvore representada na figura 9. Cada combinação de estados de caracteres foi representada por uma cor diferente, sendo azul $x = 0$ e $y = 0$; vermelho $x = 0$ e $y = 1$; verde $x = 1$ e $y = 0$; e rosa $x = 1$ e $y = 1$. Quanto mais para a direita, maior a probabilidade posterior de uma determinada combinação de caracteres para cada nó. ($x = 0$: pouso com asas fechadas; $x = 1$: pouso com asas abertas; $y = 0$: forrageio do tipo *gleaner*; $y = 1$: forrageio do tipo *sallier*). 33
- Figura 11:** Log da verossimilhança de diferentes combinações de taxas de transição. a) azul: unrestricted: sem restrições, todas as taxas são independentes. b) Vermelho ($q_{31} = q_{42}$): modo de pouso pode mudar de asa aberta para fechada independente do tipo de forrageio. c) Verde ($q_{21} = q_{43}$): o tipo de forrageio pode mudar de *sallier* para *gleaner* independente do modo de pouso. d) Rosa ($q_{13} = q_{24}$): o modo de pouso pode mudar de asa fechada para asa aberta independente do tipo de forrageio. e) Preto ($q_{12} = q_{34}$): o tipo de forrageio pode mudar de *gleaner* para *sallier* independente do modo de pouso..... 35
- Figura 12:** Riqueza relativa das famílias de Epiprocta. Retirada de Misof (2002)..... 41
- Figura 13:** Asa posterior de Libellulidae realçando a alça anal em forma de pé. Retirada de www.sonic.net. 42
- Figura 14:** *Rencordulia sinica* (Araripelibellulidae), espécie fóssil descrita basicamente por caracteres de venação alar, devido à melhor preservação das asas do que do corpo. Retirada de Fleck *et al.* (2008c). 45
- Figura 15:** Produtos de amplificação visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% para quantificação das bandas obtidas. 53
- Figura 16:** Exemplo de visualização de cromatogramas no programa Consed (Gordon 2004). 54
- Figura 17:** Árvore filogenética obtida por meio de análise bayesiana. Os valores ao lado dos nós internos da árvore correspondem às probabilidades posteriores de cada nó. À direita dos nomes das espécies estão relacionadas as respectivas subfamílias. B – Brachydiplacinae, S – Sympetrinae, Z – Zygonichinae, T – Trameinae, U – Urothemistinae, Te – Tetrathemistinae, Tr – Trithemistinae, L – Leucorrhinae, Li – Libellulinae, P – Palpopleurinae e O – Onychothemistinae. Para simplificar a árvore, sempre que espécies de um mesmo gênero agruparam em um grupo monofilético com $PP > 0,95$, estas espécies foram representadas pelo nome do gênero seguido por spp. Os nomes das espécies estão especificados nas tabelas 6 e 7. 56
- Figura 18:** Árvore filogenética linearizada, com tamanhos de ramos proporcionais aos tempos de divergência, em milhões de anos, representados na barra horizontal abaixo da árvore. Os números em vermelho correspondem à identificação dos nós, cujos tempos de divergência encontram-se na tabela 11. Os círculos vermelhos marcam os nós calibrados pelo registro fóssil. 58

ABREVIATURAS E SIGLAS

.	BF	<i>Bayes Factor</i>
.	IB	Inferência Bayesiana
.	KT	Extinção em massa entre o Cretáceo e o Terciário
.	LR	<i>Likelihood Ratio test</i>
.	M	Veia média
.	MAA	Milhões de Anos Atrás
.	MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
.	MCMCMC	<i>Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo</i>
.	MF	<i>Midair Flier</i>
.	MH	Média Harmônica
.	ML	<i>Maximum Likelihood</i>
.	MP	Máxima Parcimônia
.	MPe	<i>Midair Percher</i>
.	MRCA	<i>Most Recent Common Ancestor</i>
.	MV	Máxima Verossimilhança.
.	NJ	<i>Neighbor Joining</i>
.	OTU	<i>Operational Taxonomic Unit.</i>
.	PAA	Espécies que pousam de asas abertas
.	PAF	Espécies que pousam de asas fechadas
.	PERD	Parque Estadual do Rio Doce
.	PIH	<i>Phylogenetic Inertia Hypothesis</i>
.	PP	Probabilidade Posterior
.	QTH	<i>Quick Takeoff Hypothesis</i>
.	R	Veia Radial
.	rpm	Rotações Por Minuto
.	SWH	<i>Shiny Wing Hypothesis</i>
.	TH	<i>Termorregulation Hypothesis</i>
.	TMCR	<i>time to the Most Recent Common Ancestor</i>
.	WDH	<i>Wing Display Hypothesis</i>

RESUMO

VAN DE KOKEN, Antonia Figueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Evolução molecular em Odonata: comportamento de pouso em Zygoptera e tempo de divergência em Libellulidae (Eiprocta)**. Orientadora: Karla Suemy Clemente Yotoko. Co-orientadores: Daniela Chaves Resende e Jorge Abdala Dergam dos Santos.

A ordem Odonata é atualmente subdividida em duas subordens, Zygoptera e Eiprocta. Estes insetos apresentam alta variabilidade morfológica e comportamental, que foram relativamente pouco estudadas em termos evolutivos. Neste trabalho, foram utilizadas hipóteses filogenéticas baseadas em sequências de DNA mitocondrial para testar hipóteses relacionadas ao comportamento de pouso (com as asas abertas ou fechadas) em Zygoptera (capítulo 1), e para estudar a subdivisão taxonômica da família Libellulidae (Eiprocta) – capítulo 2. A posição das asas durante o pouso é um caráter filogeneticamente restrito, que deve estar associado tanto ao comportamento de forrageio, mais especificamente à velocidade de respostas do animal, quanto à habilidade de se manter críptico aos predadores: se uma espécie for suficientemente rápida pode ser conspícua (pousar de asas abertas), e se for críptica (pousar de asas fechadas), pode ser lenta. No capítulo 2, testou-se a subdivisão de Libellulidae em subfamílias. Esta subdivisão não tinha sido recuperada por outros trabalhos envolvendo a filogenia molecular da família, o que poderia ser atribuído à amostragem insuficiente de espécies, uma vez que estavam ausentes gêneros e subfamílias da América do Sul. A inclusão de mais espécies não resolveu a subdivisão. Porém, conclui-se que Libellulidae é uma família muito antiga, que sobreviveu à grande extinção em massa KT (final do Cretáceo e início do Terciário) e apresenta três momentos de expansão do número de espécies: o primeiro devido à expansão das angiospermas, que se iniciou há 100 milhões de anos atrás (MAA); o segundo há 65 MAA, logo após a grande extinção KT; e o terceiro há 34 MAA, durante um resfriamento da Terra que substituiu florestas úmidas por gramados, permitindo a expansão de espécies que ocorrem em áreas abertas. Estes são os primeiros resultados de uma série de estudos envolvendo membros da ordem Odonata, que se destinam a compreender, através de testes de hipóteses, a evolução de diferentes comportamentos e caracteres morfológicos.

ABSTRACT

VAN DE KOKEN, Antonia Figueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2010. **Molecular evolution in Odonata: behavior of landing in Zygoptera and time of divergence in Libellulidae (Epiprocta)**. Adviser: Karla Suemy Clemente Yotoko. Co-advisers: Daniela Chaves Resende and Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The order Odonata is currently divided into two suborders, Zygoptera and Epi-procta. These insects present considerable morphological and behavioral variability, which were relatively poorly studied in evolutionary terms. In this study, we used phylogenetic hypotheses based on mitochondrial DNA sequences to test hypotheses related to the behavior of landing (with the wings open or closed) in Zygoptera (Chapter 1), and check the taxonomic subdivision of the family Libellulidae (Epiprocta) - Chapter 2. The results of Chapter 1 suggest that the landing wing position is a phylogenetically restricted character, which should be associated with either the foraging behavior (specifically the speed of responses of the animal) and their ability to remain cryptic to predators. If one species is fast enough, it can be conspicuous (land with open wings), and if it is cryptic (land with wings closed), it can be slow. In Chapter 2 we tested the subdivision of Libellulidae within subfamilies, which was not found in other molecular phylogenetics studies. This lack of resolution could be attributed to insufficient sampling species since genera and subfamilies of South America were absent. However, the inclusion of more species did not solve the subdivision. We found, using molecular clock techniques that Libellulidae is an old family, which survived to the great mass extinction KT (late Cretaceous and early Tertiary, 65 Mya). In addition, it suffered three expansions of the number of species: the first due to expansion of angiosperms (which began 100 Mya), the second after the great KT extinction; and the third during a cooling of the Earth that replaced rainforests by lawns, allowing the expansion of species found in open areas was 34 Mya. These chapters represent the beginning of a series of studies involving the order Odonata, which have the objective of understand, through hypothesis tests, the evolution of different behaviors and morphological characters.

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos Gerais da Ordem Odonata

Os representantes da ordem Odonata são insetos predadores cujas larvas vivem em ambientes aquáticos e apresentam alta diversidade em domínios tropicais. As larvas são predadores generalistas aquáticos (algumas semi-aquáticas), enquanto os adultos são predadores generalistas aéreos (Corbet 1999). Estão entre os insetos alados com características mais semelhantes aos estados mais primitivos (Bybee *et al.* 2008), incluídos no grupo Paleoptera (Odonata e Ephemeroptera).

Uma das características mais estudadas do grupo é a diversidade de sistemas de acasalamento, os quais provavelmente surgiram em decorrência da forte competição espermática em algumas espécies (Waage 1979, Corbet 1999). A defesa de território pode ser pré ou pós-cópula. No primeiro tipo, os machos defendem o território até a conquista de uma fêmea e o acasalamento é finalizado com a cópula (Figura 1). No segundo tipo pode haver a guarda da fêmea pelo macho, tanto por contato físico (guarda por contato), quanto apenas visualmente, onde o macho monitora a fêmea (Alcock 1982), garantindo que seu esperma não seja removido por outro macho até a oviposição pela fêmea.

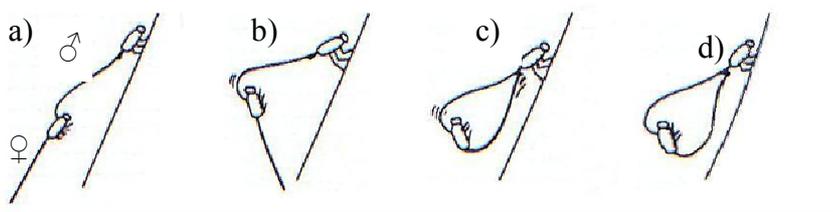


Figura 1: Acasalamento de *Heteragrion consors*, mostrando uma sequência de comportamentos: a) tandem pré-copulatório, b) convite à cópula, c) toque genital, d) cópula. Retirado de Loiola (2005).

A genitália masculina é o principal órgão da competição espermática (Fincke 1997, Artiss 2001) e estima-se que tenha evoluído rapidamente, gerando a grande variabilidade observada em resposta à forte competição espermática (Miller 1995, Artiss 2001), provavelmente guiada por seleção sexual (Cordero *et al.* 1995, Sawada 1998, Artiss 2001). A seleção sexual pós-copulatória é mais intensa quando fêmeas copulam múltiplas vezes e com diversos machos, estocando esperma e adiando a fertilização (Siva-Jothy & Hooper 1996; Córdoba-Aguilar 2005).

A ordem Odonata é dividida em duas subordens, Zygoptera e Eiprocta (Anisoptera + Epiophlebiidae) (Corbet 1999, Bybee *et al.* 2008), com aproximadamente 5.680 espécies de 643 gêneros distribuídos em 34 famílias (Schorr *et al.* 2007), sendo 2.739 espécies em 19 famílias de Zygoptera e 2.941 espécies em 15 famílias de Eiprocta.

Estima-se que ainda haja cerca de 1000 a 1500 espécies não descritas em Odonata (Kalkman *et al.* 2008). De acordo com estes autores, as regiões Oriental, Australiana e principalmente a Neotropical são as regiões nas quais a ordem apresenta a maior diversidade e provavelmente possuem a maior quantidade de espécies ainda não descritas (Figura 2).

As anisópteras (subordem Eiprocta) são normalmente grandes e robustas, com cabeças globulares e com diferentes formatos das asas posteriores e anteriores, enquanto as zigópteras são tipicamente pequenas, olhos alongados transversalmente, asas posteriores e anteriores similares e vôos lentos (Corbet 1999). A maioria das zigópteras pousa com as asas fechadas, e quase todas as anisópteras pousam com as asas abertas (Figura 3).

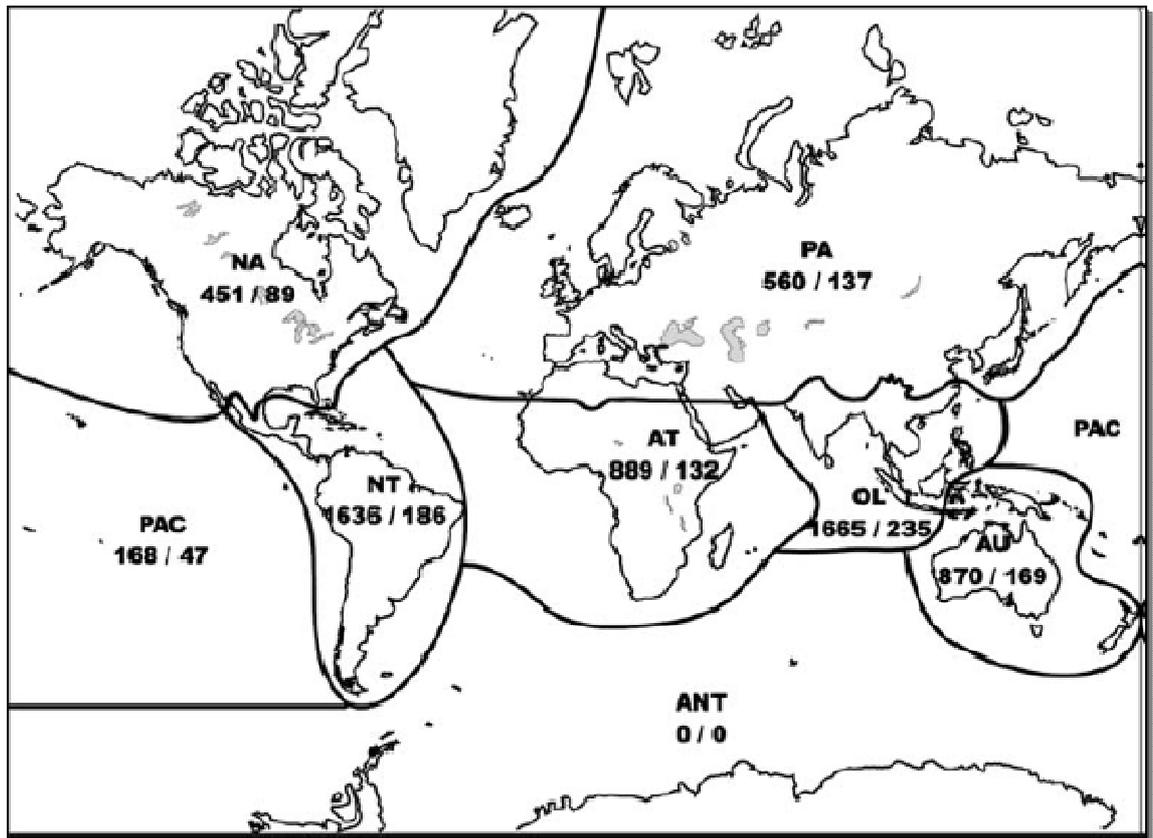


Figura 2: Diversidade de Odonata por região biogeográfica. Os números representam número de espécies / número de gêneros. PA – Paleártico; NA – Neártico; NT – Neotropical; AT – Afrotropical; OL – Oriental; AU – Australasiano; PAC – Ilhas do Oceano Pacífico; ANT – Antártica. Retirado de Kalkman *et al.* (2008).



Figura 3: A anisóptera *Perithemis* sp. e a zigóptera *Hetaerina* sp. Fotos: Luiz Gustavo Souto Soares.

Todas as espécies de Zygoptera (com exceção em Pseudostigmatidae) são pou-sadoras, ou *perchers* (que permanecem a maior parte do tempo em um poleiro), enquan-

to algumas espécies de Epiprocta são voadoras, ou *fliers* (em constante atividade de vôo), com exceções em alguns membros de Gomphidae e de Libellulidae. Existe ainda uma terceira classificação, porém utilizada para um grupo restrito, membros de Trameinae (como *Pantala* e *Tramea*), denominado *gliders* (planadoras), que inclui espécies com um grande desenvolvimento do campo anal da asa posterior. Em geral são espécies migratórias, que possuem a capacidade de planar utilizando correntes de ventos, o que permite que voem por longas distâncias com gasto mínimo de energia (Corbet 1999).

Os adultos de Odonata se alimentam de presas vivas, que podem ser capturadas no ar (*midair*) ou em substratos (*gleaning*) (Corbet 1999). O modo *midair* é subdividido em dois: *midair-flier* (*MF*) e o *midair-percher* (*MPe*). *MF* é mais diverso e variável do que *MPe*, e geralmente o forrageio ocorre durante a patrulha de adultos, frequentemente em torno de copas de árvores e em alturas diferentes, onde o indivíduo muitas vezes utiliza correntes de ar para planar. O vôo do modo *MPe* consiste em uma decolagem repentina, em direção à presa, e, após a captura da presa, o indivíduo retorna ao poleiro de origem. *Fliers* e *perchers* forrageiam pelo modo *MF*, e somente *perchers* forrageiam pelo modo *MPe* (Corbet 1999). Em outra classificação, Paulson (2004) denominou espécies que forrageiam no modo *MPe* como *salliers* e as que forrageiam no substrato como *gleaners*.

Hipóteses e sugestões sobre a evolução de Odonata podem ser mais bem resolvidas por inferências filogenéticas em conjunto com análises comparativas. As relações filogenéticas entre as famílias de Odonata, e conseqüentemente de suas subordens, ainda não estão esclarecidas. A maioria dos estudos nesse âmbito foi baseada em caracteres morfológicos (Fraser 1957, Carle 1982, Pfau 1991, Trueman 1996), mas existe um crescente aumento de estudos moleculares (Saux *et al.* 2003, Hasegawa & Kasuya 2006, Pilgrim & Von Dohlen 2008, Ware *et al.* 2007, Fleck *et al.* 2008a).

Objetivos

O presente trabalho visa explorar duas questões dentro de Odonata: a primeira aborda a subordem Zygoptera, verificando por meio de análises comparativas se há sinal filogenético para os caracteres de comportamento de vôo e captura de presas. A segunda discussão aborda a família Libellulidae (Epirocta) e suas divisões em subfamílias, assim como inferências feitas a partir do relógio molecular a respeito dos tempos de divergência entre as espécies.

Métodos Filogenéticos

Atualmente não existe um consenso quanto à definição de qual seja o melhor método de inferência filogenética. Os métodos mais utilizados são: *Neighbor-Joining (NJ)* (Saitou & Nei 1987); *Máxima Parcimônia (MP)*; *Máxima Verossimilhança (MV)* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967, Felsenstein 1981); e *Inferência Bayesiana (IB)* (Yang & Ranalla 1997). Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens.

O *NJ* é um método baseado em distâncias entre as sequências. Sua principal vantagem é a rápida obtenção da árvore, bem como das árvores das pseudo-replicações, o que permite a obtenção rápida do *bootstrap* (Efron *et al.* 1996). A principal objeção a este método é o fato de gerar apenas uma árvore, baseada nas distâncias entre as *OTUs* (Unidades Taxonômicas Operacionais, ou seja, as sequências em estudo).

Por outro lado, os métodos de *MP* e *MV* são métodos de busca da melhor árvore segundo dois critérios diferentes. A *MP* se baseia na idéia de que a evolução deve ter acontecido da forma mais simples possível, ou seja, na idéia de que a natureza é parcimoniosa, e de que hipóteses *ad hoc* devem ser evitadas, sempre que possível. No caso de estudos com caracteres moleculares, é necessário testar todas as topologias na busca

daquela que apresente o menor número de substituições nucleotídicas possível. A *MV* se baseia em um modelo que descreve os dados, ou seja, que indica quais as probabilidades de mudança de um determinado nucleotídeo para outro em diferentes regiões das sequências em estudo. A partir deste modelo, o método busca pela topologia que mais se ajuste ao modelo e ao alinhamento proposto.

A depender do número de *OTUs*, tanto *MP* quanto *MV* podem ser muito lentos, o que se torna um problema ainda maior dada a necessidade de testar a confiabilidade dos nós internos da árvore a partir do teste de *bootstrap*, que requer pelo menos 100 replicações (a busca da melhor árvore é lenta, e a busca por uma pseudoreplicação de *bootstrap* é tão lenta quanto a busca da melhor árvore. Portanto, é necessário multiplicar o tempo de busca de uma única árvore pelo número de replicações de *bootstrap*). A *MP* oferece ainda a desvantagem de não fornecer boas estimativas de tamanhos de ramos, muito importantes na interpretação dos dados.

A *IB* também pode requerer um tempo grande para estimar a hipótese filogenética. No entanto, tem a vantagem de buscar, dentro do universo de topologias, tamanhos de ramos e parâmetros possíveis, aqueles que apresentem a melhor probabilidade posterior de explicar os dados (o alinhamento das sequências).

As árvores obtidas no presente trabalho foram inferidas pela *IB*. Este método oferece um procedimento estatístico para o cálculo de uma probabilidade posterior, que é dada pela seguinte equação:

$$Prob(H|D) = \frac{ProbH Prob(D|H)}{ProbD} \quad (1)$$

Onde:

- i. H é o modelo, que inclui a topologia da árvore, tamanhos de ramos, estimativas retiradas da análise das sequências, como proporção de cada uma das quatro bases; bem como parâmetros de substituição de nucleotídeos como taxas de *transição/transversão*, proporção de sítios invariáveis, probabilidades de mudança de cada uma das bases para qualquer outra e dados sobre a heterogeneidade da sequência, medido pelo parâmetro *gamma*;
- ii. D são os dados em análise, no caso da *IB*, o alinhamento das sequências.

Com isso,

- iii. $Prob(H|D)$ é a probabilidade posterior de um determinado modelo dado um determinado conjunto de dados;
- iv. $ProbH$ é a probabilidade *a priori* de um determinado modelo (que pode ser chamado de modelo 1);
- v. $Prob(D|H)$ é a verossimilhança dos dados considerando o modelo 1; e
- vi. $ProbD$ é a soma das verossimilhanças dos dados sob todos os modelos possíveis (1, 2, 3, ..., n).

Vista assim, a estimativa pode parecer muito complexa, uma vez que é necessário saber a probabilidade *a priori* de cada modelo. Considerando que o número de modelos possíveis tende a infinito, uma vez que pequenas variações em cada parâmetro modificam o modelo, é virtualmente impossível determinar a probabilidade *a priori* de cada um. Com isso, podemos considerar que todos os modelos possíveis são igualmente prováveis, criando uma distribuição *flat* ou plana, de modelos *a priori*.

Outra dificuldade que pode surgir nesta análise é a determinação do denominador desta equação. Este problema é facilmente resolvido com o uso de uma Cadeia de

Markov avaliada pelo algoritmo de Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, também conhecido como *MCMC*), um método de busca passo a passo, que tem como princípio geral o fato de que o passo 2 só depende do passo 1.

Para a análise bayesiana, podemos considerar que o modelo 1 é o passo 1. Este modelo deve ter todos os parâmetros definidos no item i acima. Na prática, o modelo 1 é um modelo qualquer, de uma topologia qualquer com quaisquer tamanhos de ramos. Para passar do passo 1 para o 2, é necessário modificar o modelo. Esta modificação é feita em apenas um dos parâmetros do modelo, e é uma modificação muito pequena. Com isso, podemos representar os dois modelos consecutivos da seguinte maneira:

$$Prob(M1|D) = \frac{ProbM1 Prob(D|M1)}{ProbD} \quad (2)$$

$$Prob(M2|D) = \frac{ProbM2 Prob(D|M2)}{ProbD} \quad (3)$$

Para comparar os dois modelos, é necessário apenas saber a razão entre a probabilidade posterior do modelo 2 e o modelo 1:

$$\frac{Prob(M2|D)}{Prob(M1|D)} = \frac{\frac{ProbM1 Prob(D|M2)}{ProbD}}{\frac{ProbM2 Prob(D|M1)}{ProbD}} \quad (4)$$

Como as probabilidades *a priori* dos modelos 1 e 2 são idênticas, bem como a $ProbD$, então é possível eliminar estes termos do lado direito da equação, restando:

$$\frac{Prob(M2|D)}{Prob(M1|D)} = \frac{Prob(D|M2)}{Prob(D|M1)} \quad (5)$$

Ou seja, a razão da probabilidade posterior do modelo 2 sobre o modelo 1 é igual à razão de verossimilhança entre os dois modelos. Com isso, basta calcular a verossimilhança de cada um deles, de modo que:

$$R = \frac{\text{Prob}(D|M2)}{\text{Prob}(D|M1)} \quad (6)$$

Se $R > 1$, então o modelo 2 passa a ser o modelo de referência, ou seja, vai ter um de seus parâmetros modificado para gerar o modelo 3, que será comparado da mesma maneira.

Se $R < 1$, então é necessário levar em conta o valor de R . Com isso, o modelo 1 passará a ser o modelo de referência com probabilidade R . Ou seja, quanto maior o valor de R , mais provável é a aceitação do modelo 2. Para aceitar ou rejeitar o modelo 2, é gerado um número aleatório entre 0 e 1. Se o número gerado for menor que R , o modelo 2 é aceito, se for maior que R , o modelo 2 é rejeitado. Caso o modelo 2 seja rejeitado, o modelo 1 continua a ser a referência, e deve ter outro parâmetro modificado, ou ser modificado de outra maneira.

Com este procedimento, um modelo aleatório aos poucos vai sendo modificado e a probabilidade posterior vai aumentando. A limitação deste algoritmo é que a análise pode ficar paralisada num ótimo local. A figura 4 dá uma noção do cenário de valores possíveis de verossimilhança, e apresenta um exemplo gráfico de ótimos locais e um de ótimo global.

Para contornar o problema de análises que ficam estagnadas em ótimos locais que não podem ser transpostos, utiliza-se a modificação de Metrópolis, o que gera o algoritmo *Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo*, ou *MCMCMC*. Através deste algoritmo, um conjunto de cadeias é iniciado, de modo que seja possível comparar

o ponto em que se encontra cada uma e verificar qual delas está no ponto de melhor verossimilhança.

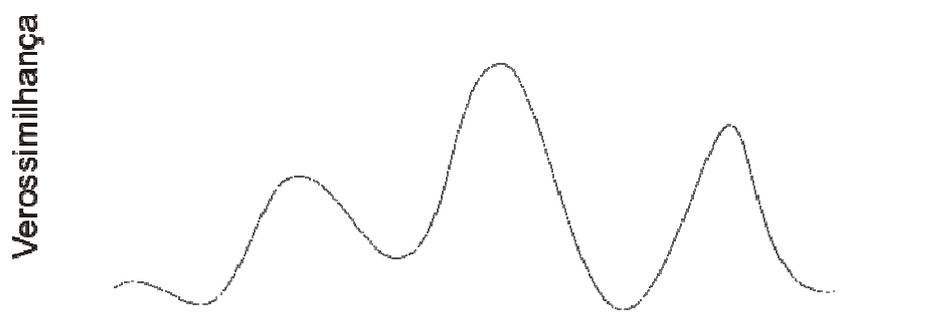


Figura 4: Representação de valores relativos de verossimilhança. O eixo Y representa valores crescentes de Verossimilhança. Dois ótimos locais (picos à direita e à esquerda) e um ótimo global (pico maior ao centro).

São em geral utilizados dois conjuntos, cada um com 4 cadeias. Destas quatro cadeias, três são consideradas cadeias quentes e uma é considerada cadeia fria. A diferença entre estas cadeias é a quantidade de modificações feitas por “passo” da cadeia de Markov. Nas cadeias quentes, os “passos” são mais largos, o que significa que os parâmetros mudam mais de um passo para o outro do que na cadeia fria, na qual os passos são bem pequenos (uma pequena mudança em apenas um parâmetro). O algoritmo funciona de modo que a cadeia que esteja na posição mais alta do cenário é a cadeia fria, as demais são cadeias quentes. Com isso, é possível testar vários parâmetros, topologias e tamanhos de ramos distintos. O *status* “cadeia fria” se alterna ao longo da corrida, de modo que se uma cadeia quente atingir um local mais alto passa a ser a cadeia fria. Como são utilizados dois conjuntos de 4 cadeias, cada um com 3 cadeias quentes e 1 fria, a convergência das corridas é testada pela convergência das cadeias frias. Depois que ambas atingirem o mesmo pico, considera-se que a análise encontrou um potencial ótimo global. A partir daí as cadeias correm por mais alguns milhares ou milhões de passos e a análise pode ser terminada.

Terminada a análise, os últimos passos das cadeias frias são utilizados para a construção de uma árvore consenso. Cabe lembrar que cada passo corresponde a uma árvore, com sua topologia, tamanhos de ramos e parâmetros do modelo de substituição. Os últimos passos da análise correspondem ao conjunto de melhores hipóteses para explicar os dados, ou ao conjunto de melhores hipóteses filogenéticas.

Esta mesma análise é feita pelo menos cinco vezes. Se em todas as cinco vezes o método recuperar a mesma topologia consenso, com os mesmos parâmetros, considera-se que o método atingiu um ótimo global.

Métodos Comparativos

Os métodos comparativos filogenéticos buscam evidências de evolução adaptativa investigando como certas características dos organismos, como tamanho, forma, história de vida e comportamento, evoluem juntas ou de forma correlacionada (Harvey & Pagel 1991, Pagel 2004). O método comparativo é a técnica mais comumente utilizada para fazer perguntas sobre padrões de mudanças evolutivas (Harvey & Pagel 1991). Estudos comparativos de diferentes espécies mostram a amplitude de estratégias que os animais adotam na natureza, e um método poderoso para estudar adaptação é a comparação de grupos de espécies relacionadas (Krebs & Davies 1996, Pagel 1999).

As correlações entre características encontradas em grupos de organismos contemporâneos podem ser o resultado de adaptações de fato correlacionadas ou ter razão histórica, uma vez que podem ter sido herdadas de espécies ancestrais que apresentavam estas mesmas características (Pagel 1999).

Alguns testes foram desenvolvidos para verificar as correlações entre caracteres discretos de modo a desconsiderar o fator histórico (Ridley 1983, Maddison 1990). Para tanto, é necessário inferir a filogenia dos organismos em estudo e depois inferir os esta-

dos ancestrais dos nós internos destas filogenias. A figura 5 mostra um exemplo de árvore filogenética na qual foram mapeados os estados atuais de dois caracteres binários, e inferidos os estados ancestrais de cada caráter em cada nó interno.

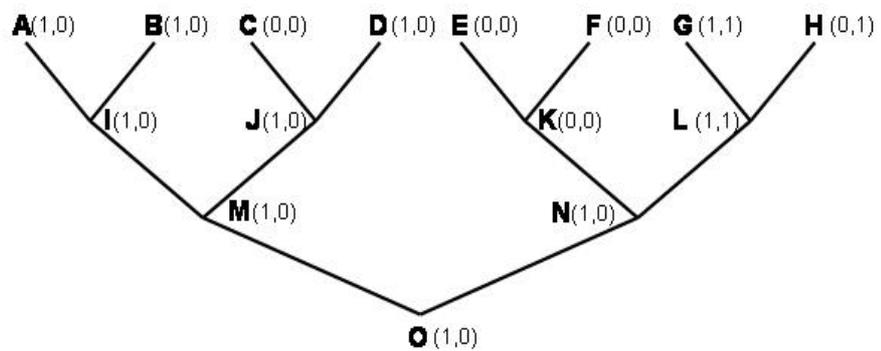


Figura 5: Árvore hipotética, na qual foram mapeados os estados atuais de dois caracteres, x e y (representados por seus estados 0 ou 1 nos nós A a H) e inferidos os estados ancestrais destes mesmos caracteres, que foram mapeados nos nós ancestrais (I a O).

Pagel (1994) propôs uma nova abordagem para detectar evolução correlacionada de caracteres discretos, livre da dependência de estados inferidos nos nós internos. Neste modelo, todas as transições possíveis entre estados de caracteres são estudadas, medindo sua probabilidade de ocorrência e utilizando a informação de tamanhos de ramos.

Essa abordagem utiliza o modelo Markov tempo-contínuo, que, de maneira semelhante aos modelos de substituição nucleotídica (Jukes & Cantor 1969, Kimura 1980), define taxas instantâneas para estimar modificações de estado (transições) em pares de caracteres binários. Esse modelo calcula a probabilidade de modificações em caracteres discretos de acordo com dois modelos de evolução.

No primeiro modelo, denominado modelo independente, os caracteres x e y evoluem independentemente na árvore. Cada caráter é descrito por uma matriz 2x2 na qual cada caráter adota dois estados, 0 ou 1. Isso cria dois parâmetros por caráter (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros a serem estimados pelo modelo independente, onde os caracteres x e y se modificam entre os dois estados possíveis de maneira independente. A tabela pode representar o caráter x ou y .

Estado	0	1
0	-	q_{01}
1	q_{10}	-

No segundo modelo, denominado modelo dependente, os caracteres evoluem de forma correlacionada, de forma que a taxa de modificação de um caráter depende do estado do outro caráter. O modelo dependente adota quatro estados, um para cada combinação dos dois caracteres binários (0,0; 0,1; 1,0; 1,1). Estes estados são representados na tabela 2 e as taxas de transição descrevem todas as modificações possíveis em um caráter mantendo o outro constante. O modelo não leva em conta transições duplas (simultâneas em ambos os caracteres), uma vez que as transições são instantâneas e a probabilidade de que os dois parâmetros se modifiquem exatamente ao mesmo tempo é desprezível. A figura 6 mostra as transições possíveis nos modelos dependente e independente.

Tabela 2: Parâmetros a serem estimados pelo modelo dependente, onde os caracteres x e y se modificam entre os dois estados possíveis de maneira dependente. Na determinação dos estados, o número à direita se refere ao caráter x e o número à esquerda se refere ao caráter y .

Estado	0,0	0,1	1,0	1,1
0,0	-	q_{12}	q_{13}	-
0,1	q_{21}	-	-	q_{24}
1,0	q_{31}	-	-	q_{34}
1,1	-	q_{42}	q_{43}	-

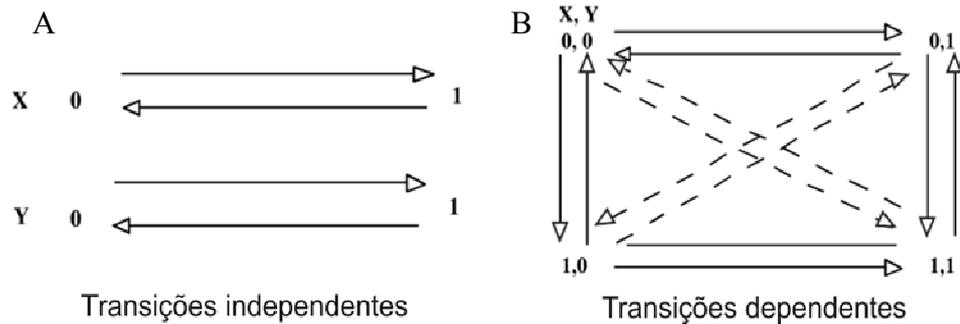


Figura 6: Transições entre estados de caracteres no modelo A) independente e B) dependente. Modificado de Pagel (2004).

Para determinar se um modelo explica os dados encontrados de maneira significativamente melhor do que o outro, podem ser utilizados vários testes estatísticos, dos quais dois serão destacados por serem os mais amplamente utilizados. O Likelihood Ratio test (LR) é frequentemente utilizado para comparar duas verossimilhanças derivadas de modelos aninhados (*nested models*, ou seja, um dos modelos pode ser considerado um caso especial do outro). O LR pode ser calculado como:

$$LR = 2 [\log \text{Likelihood}(\text{melhor modelo}) - \log \text{likelihood}(\text{pior modelo})]$$

O LR apresenta a distribuição de χ^2 e o número de graus de liberdade é calculado pela diferença entre o número de parâmetros entre os modelos. No caso dos dois modelos em questão, o teste deve ser realizado considerando quatro graus de liberdade ($g.l. = n = 8 - 4 = 4$).

Quando os modelos não são aninhados, não é necessário utilizar a distribuição de χ^2 e o LR é utilizado para comparar as verossimilhanças de hipóteses alternativas. Se $LR \geq |2|$ (uma diferença maior ou igual a 2 em módulo), a diferença é considerada significativa (a hipótese com maior verossimilhança é significativamente melhor).

O problema do LR é presumir que a verossimilhança é ou está muito próxima de seu valor máximo.

Quando cadeias de Markov (MCMC) são utilizadas, é recomendável testar a significância das diferenças pelo Bayes Factor (*BF*). A lógica é similar à do *LR*, porém as verossimilhanças marginais dos dois modelos são comparadas, ao invés das máximas verossimilhanças.

A verossimilhança marginal de um modelo é a integral das verossimilhanças dos modelos em todos os valores de parâmetros em todas as árvores possíveis¹. Na prática, a verossimilhança marginal é difícil de estimar, porém foi demonstrado empiricamente que se aproxima da média harmônica das verossimilhanças quando a cadeia de Markov é calculada por milhões de gerações (Pagel & Meade 2006a).

O programa BayesTraits (Pagel e Meade 2006b) calcula o logaritmo da média harmônica das verossimilhanças à medida que é executado, e ignora as verossimilhanças encontradas durante o período de *burnin*, enquanto os resultados ainda não convergiram. As médias harmônicas (*MH*) são então comparadas da seguinte maneira:

$$2\{\log[\text{MH}(\text{melhor modelo})] - \log[\text{MH}(\text{pior modelo})]\}$$

Qualquer valor positivo favorece o modelo dependente (com mais parâmetros), mas convencionalmente um valor menor que 3 não é considerado significativo; valores entre 3-12 são considerados evidências significativas, maiores que 12 evidências fortes e maiores que 150 muito fortes (Raftery 1996).

¹ Como as árvores filogenéticas apresentam vários pontos de incerteza, evidenciados por politomias, é necessário levar em conta todas as possibilidades de solução de cada politomia. Conforme explicitado na sessão “Métodos Filogenéticos”, a IB gera uma árvore consenso, cujos valores dos nós internos correspondem à probabilidade posterior de cada nó, calculada a partir da frequência de aparecimento destes nós no conjunto de melhores árvores obtidos na análise. Para calcular a verossimilhança marginal dos modelos de evolução de caracteres é então considerado um conjunto de “melhores árvores”. Por uma questão de tempo computacional requerido, neste trabalho foram consideradas as 500 melhores árvores da IB.

Relógio Molecular

O relógio molecular parte do princípio que a taxa de substituição de aminoácidos nas sequências de proteínas é aproximadamente constante ao longo do tempo em todas as linhagens evolutivas (Zuckerlandl & Pauling 1965), apesar do número real de substituições ser objeto de erros estocásticos (Nei & Kumar 2000). Se macromoléculas evoluem em taxas constantes, então podem ser usadas para datar tempos de especiação e outros tipos de eventos evolutivos, exatamente como é feita a datação de tempos geológicos usando elementos radioativos.

O conceito de relógio molecular possui uma longa história de controvérsias e ainda é amplamente discutido. A controvérsia é centrada principalmente na acurácia do relógio e nos mecanismos de substituição de nucleotídeos ou aminoácidos. Uma grande parte da controvérsia reside na teoria neutra de Kimura (1968), que prediz que a vasta maioria das mutações de ponto encontradas no genoma não afeta o valor adaptativo dos organismos.

Se a hipótese de substituições neutras for verdadeira, e se a taxa de substituições neutras em uma proteína ou molécula de DNA não sofrer mudanças com o tempo, a taxa de evolução nessa macromolécula pode ser considerada constante, e, portanto, a divergência entre as sequências é tanto maior quanto maior for o tempo que se passou desde que se separaram (Bromham & Penny 2003).

Para utilizar as distâncias genéticas na estimativa do tempo de divergência entre táxons, é necessário calibrar o relógio, pois as taxas de mudança podem variar entre os organismos e entre os genes. A calibração é usualmente calculada para cada conjunto de dados (alinhamento) utilizando um ou mais pontos de calibração conhecidos. Estes pontos são geralmente fornecidos pelo registro fóssil, que normalmente é datado pela taxa

de substituição de um isótopo radioativo, sendo a mais comum delas a taxa de substituição do carbono 14 pelo carbono 12. Por exemplo, se desejarmos saber qual a data da divergência entre Zygoptera e Epiprocta, é necessário recorrer aos fósseis disponíveis e verificar qual o registro mais antigo de qualquer uma das duas subordens. Esta abordagem parte do princípio de que, se um organismo fóssil já apresentava as características de uma das subordens, então a separação das duas já havia ocorrido. Com isso, o ponto de calibração é a idade mínima da divergência entre os táxons. Existem, porém, outras maneiras de datar a divergência entre organismos, como as datações de formação de ilhas e registros geográficos e geológicos (Bromham & Penny 2003).

Da calibração depende a precisão da estimativa, uma vez que as estimativas de tempo de divergência diferem, em muito, de acordo com diferentes calibrações (Bromham *et al.* 1999). Poucos estudos apresentam datações com intervalos de confiança, que retratam a variância no relógio devido ao ruído da taxa, ou da variação nas taxas das linhagens. Esses intervalos de confiança permitem usar a datação molecular para testar hipóteses evolutivas (Bromham & Penny 2003).

CAPÍTULO 1-Evolução do comportamento de pouso em *Zygoptera*

Introdução

A subordem *Zygoptera* possui aproximadamente 2.739 espécies distribuídas em 19 famílias. Seu monofiletismo é controverso. Embora estudos morfológicos tenham usado diferentes caracteres para resolver as relações taxonômicas de Odonata, a maioria deles se concentra em caracteres baseados em veias alares e estruturas copulatórias, que, devido à grande variabilidade que apresentam, não forneceram conclusões robustas até então (Fraser 1957, Carle 1982, Pfau 1991, Trueman 1996).

Diversos trabalhos abordaram a filogenia de todos os Odonata atuais. Anisoptera sempre aparece como grupo monofilético, tendo em geral Epiophlebiidae como grupo irmão. Juntos, Anisoptera e Epiophlebiidae compõem a subordem Epirocta (Bechly 1996; Trueman 1996; Rehn 2003; Hasegawa & Kasuya 2006; Bybee *et al.* 2008; Fleck *et al.* 2008a). *Zygoptera*, por sua vez, aparece como um grupo parafilético (Figura 7) em alguns trabalhos (Trueman 1996, Saux *et al.* 2003, Hasegawa & Kasuya 2006, Fleck *et al.* 2008a), e como um grupo monofilético (Figura 8) em outros (Bechly 1996; Rehn 2003; Bybee *et al.* 2008; Carle *et al.* 2008). Apesar de seus resultados, Fleck *et al.* (2008a) afirmam que não desconsideram a possibilidade de que *Zygoptera* componha um possível grupo monofilético, e que é necessária uma melhor resolução na base da inferência filogenética.

Bybee *et al.* (2008) propuseram a inferência filogenética mais recente e mais inclusiva da ordem Odonata. Trata-se de um estudo que se baseia em caracteres morfológicos e moleculares, que inclui tanto linhagens existentes, quanto fósseis. Das 34 famílias existentes de Odonata, apenas 4 não foram amostradas em seu trabalho. Há monofiletismo de *Zygoptera* e de algumas de suas famílias, exceto Amphipterygidae, Coena-

grionidae, Protoneuridae, Megapodagrionidae e Synlestidae, que não foram consideradas.

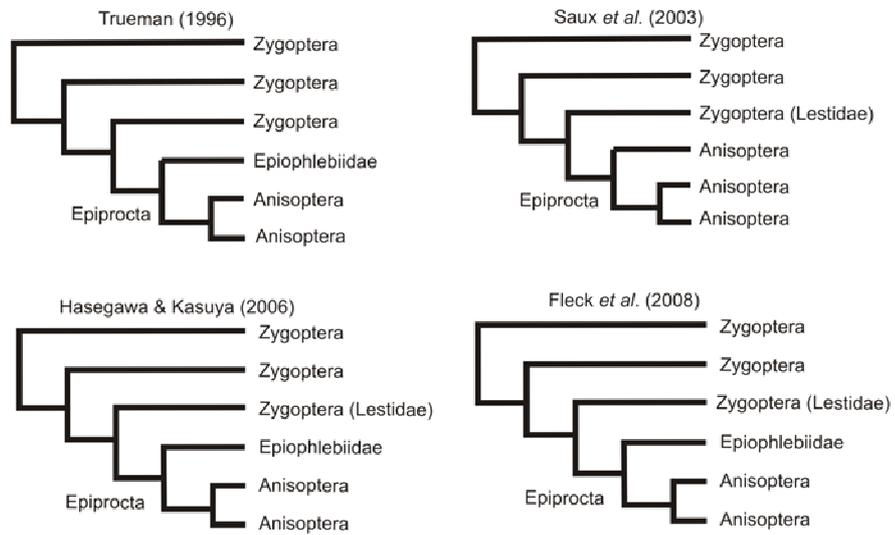


Figura 7: Esquemas simplificados de trabalhos que apresentam a subordem Zygoptera como um grupo parafilético.

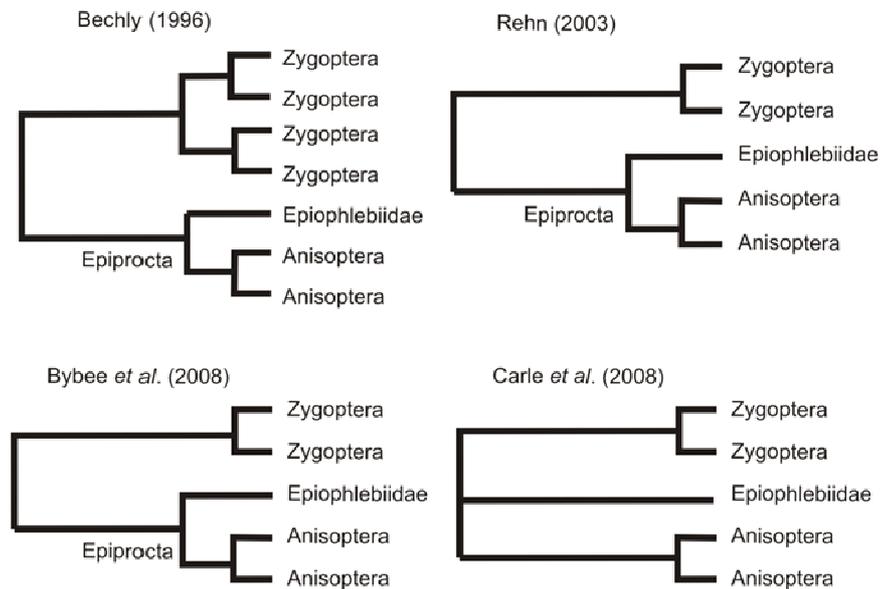


Figura 8: Esquemas simplificados de trabalhos que apresentam a subordem Zygoptera como um grupo monofilético.

Estes problemas taxonômicos relacionados à subordem Zygoptera podem ser explicados pela grande diversidade de formas e adaptações apresentadas pelas espécies incluídas nesta subordem. Existem diversas especializações dentro da subordem, seja para tipos específicos de ambiente que ocupam ou para diferentes estratégias reprodutivas.

A família Pseudostigmatidae é conhecida por suas espécies vistosas, grandes, de vôo lento e reprodução em fitotelmata, inclusive ocos de árvores (Lencioni 2005), sendo a única família dentro de Zygoptera considerada *flier* (Corbet 1999). Outras espécies também se reproduzem em fitotelmata, como *Leptagrion* e *Bromeliagrion*, gêneros de Coenagrionidae que utilizam bromélias-tanque para o desenvolvimento larval (Lencioni 2005). Algumas famílias, como por exemplo, Perilestidae e Megapodagrionidae, são exclusivas de florestas bem preservadas (Lencioni 2005). O gênero *Heteragrion* é conhecido por habitar locais bem preservados, e que abriguem riachos (Hartung 2002), e apresenta alta sensibilidade a alterações ambientais, o que resultou em duas espécies nas listagens das ameaçadas de extinção (Machado *et al.* 1998). Pode haver ainda preferências por determinados tipos de ambiente, e, dentro de uma única família, como por exemplo Coenagrionidae, encontram-se espécies de águas paradas e lagos, como as pertencentes ao gênero *Acanthagrion*; de ambientes lóticos, como as pertencentes ao gêneros *Argia*; ou espécies que ocupam diversos ambientes, desde poças d'água até ribeirões, como as pertencentes ao gênero *Ischnura* (Lencioni 2005, 2006).

Um das características mais marcantes de Zygoptera é que a grande maioria das espécies apresenta comportamento de pousar com as asas fechadas, diferente de Epiprocta, onde todas as espécies, exceto *Cordulephya pygmaea*, pousam com as asas abertas (Corbet 1999). Algumas famílias em Zygoptera, no entanto, possuem espécies que pousam com asas abertas, como Lestidae, Synlestidae e Megapodagrionidae, Diphlebiidae, Perilestidae e Dicteriadidae (Paulson 2004, Lencioni 2005).

Em 2004, Paulson fez uma revisão de todas as hipóteses já sugeridas para tentar explicar por que algumas espécies pousam de asas abertas e outras de asas fechadas. Em resumo, ele citou hipóteses relacionadas à termorregulação (*Thermoregulation Hypothesis – TH*), propostas por Jacobs em 1955, que afirma uma relação entre a posição das asas e seu efeito termorregulatório no indivíduo; à inércia filogenética (*Phylogenetic Inertia Hypothesis – PIH*), proposta por Heymer em 1975, na qual modo de pouso se deve à manutenção do estado ancestral; e ao display sexual (*Wing Display Hypothesis – WDH*), também proposta por Heymer em 1975 e reforçada pelo próprio Paulson, em 1981, que afirma que a posição das asas está relacionada com display sexual.

Para Simpson (1944), que utilizou o termo “inércia evolutiva”, a inércia filogenética representa um padrão de evolução retilíneo, resultante de seleção natural. Wilson (1975) propôs, ao contrário, que a inércia filogenética representa fatores que resistem à seleção, incluindo pré-adaptações. Mais tarde, Ridley (1983) propôs que um caráter compartilhado entre espécies relacionadas seria um indício de inércia filogenética. Por último, Burt (2001) apresentou uma analogia com a inércia da física: “uma característica com um estado não mudado permanecerá não mudado, e uma característica que experimentalmente uma mudança direcional consistente manterá esse padrão evolutivo entre ramos da árvore filogenética, a menos que uma força externa atue” (seleção natural e sexual, mutação, deriva genética ou fluxo gênico).

Paulson (2004) ainda propôs mais duas hipóteses adaptativas, a primeira afirma que há vantagens relacionadas à maior agilidade do vôo em espécies que pousam de asas abertas (*Quick Takeoff Hypothesis – QTH*), que poderiam sair do pouso mais rapidamente na captura de presas ou mesmo de fêmeas; e a segunda sugere vantagens relacionadas a permanecer menos evidente para os predadores nas espécies que pousam com as asas fechadas (*Shiny Wing Hypothesis – SWH*).

A *QTH* parte do princípio que pousar de asas abertas é uma vantagem em Odonata, uma vez que quase a totalidade dos Epiprocta pousa nesta posição. Assumindo que esta seja uma vantagem também para zigópteras, Paulson sugeriu que zigópteras que pousam de asas abertas apresentam respostas mais rápidas do que as que pousam de asas fechadas, ou se orientam mais rapidamente no voo e que isso pode estar correlacionado com aspectos de forrageio, fuga ou comportamento reprodutivo.

Considerando apenas o forrageio, a *QTH* assume que forrageadores do tipo senta e espera, que capturam presas voando e que receberam a denominação de *salliers* por Paulson², podem ser beneficiados por uma resposta mais rápida. Por outro lado, aqueles que forrageiam suas presas no substrato, classificados por Paulson como *gleaners*, podem não ter sofrido seleção para respostas rápidas.

Essa hipótese prediz que: *i.* a resposta a estímulos é mais rápida em espécies que pousam de asas abertas (*PAA*) do que nas que pousam de asas fechadas (*PAF*), e que *ii.* espécies *PAA* forrageiam tipicamente durante o voo (*sallying*), e espécies *PAF* recolhem suas presas do substrato (*gleaning*).

De acordo com Paulson (2004), ao assumir uma vantagem no voo para espécies *PAA*, haveria uma forte pressão seletiva contra zigópteras com asas fechadas no pouso. Porém, asas refletem luz solar, e também há vantagens em ser críptico para potenciais predadores. A *SWH* prediz que: *i.* espécies menores correm maiores riscos de predação, uma vez que quanto maior a presa, menor o número de predadores que conseguem predá-la, e, portanto, é mais comum que espécies menores pousem de asas fechadas; *ii.* o habitat pode influenciar na posição das asas, então é mais provável que zigópteras que

² Em comunicação pessoal, Paulson explicou que os termos *sallier* e *gleaner* são oriundos da ornitologia. *Sallier* se refere a uma ave (ou libélula) que sai do repouso (poleiro) especificamente para capturar um inseto em voo. *Gleaner*, em ornitologia, especifica uma ave que captura sua presa a partir do substrato, em geral no mesmo substrato em que está pousado. Paulson esclareceu que este termo deve ser aplicado de forma diferente a libélulas, uma vez que estas voam durante muito tempo. Com isso, ele utilizou o termo *gleaner* para se referir a espécies que capturam suas presas, que estão no substrato, durante o voo.

pousam à sombra o façam de asas abertas, uma vez que estas não brilham à sombra, o que portanto reduziria os riscos de predação.

Paulson sugeriu estas hipóteses e apresentou uma tabela, contendo 35 gêneros de *Zygoptera*, com seus respectivos comportamentos de pouso (asas abertas ou fechadas) e de forrageio (*salliers* ou *gleaners*). Destes gêneros, oito pousam com as asas abertas, sendo todos eles classificados como *salliers*, e 28 com as asas fechadas, dos quais 10 foram classificados como *salliers* e 18 como *gleaners*. A partir destes resultados, Paulson concluiu que as evidências a favor da *QTH* são esparsas, mas que não há evidências robustas contra esta hipótese e que seriam necessários mais dados para obter respostas mais conclusivas.

No entanto, testes de hipóteses para caracteres adaptativos em organismos devem ser feitos sob o ponto de vista filogenético. Apesar de Paulson ter descartado a hipótese de inércia filogenética (*PIH*) para o comportamento de pouso, espécies próximas podem compartilhar caracteres (inclusive comportamentos, de pouso ou de forrageio) simplesmente porque os herdaram de um ancestral comum (Harvey & Pagel 1991). Com isso, para poder correlacionar diferentes caracteres, como o comportamento de pouso e o de forrageio, é necessário se basear em uma hipótese filogenética, que deve ser obtida a partir de dados independentes daqueles que serão testados.

Este trabalho apresenta um teste de hipóteses para estes dois comportamentos em *Zygoptera* utilizando métodos comparativos, baseados em uma hipótese filogenética construída a partir de caracteres moleculares.

Material e Métodos

Espécies Estudadas

Para obter a hipótese filogenética, foi feita uma busca no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por sequências de espécies listadas por Paulson (2004) com comportamento de pouso e forrageio. Das sequências disponíveis, as de rRNA 28S nuclear foram as encontradas para o maior número de espécies.

O uso de métodos comparativos requer uma árvore enraizada. Portanto foi necessária a inclusão de um grupo externo. Seguindo os resultados de Rehn (2003) e Bybee *et al.* (2008), que sugerem Zygoptera como um grupo monofilético, foram incluídas três espécies pertencentes à família Libellulidae, que apresentam modo de pouso com asas abertas, como grupo irmão. O tipo de forrageio não foi considerado, pois não foi encontrada nenhuma descrição deste comportamento para essas espécies ou para qualquer outra espécie da subordem Epiprocta.

Análise das Sequências e Construção de Hipóteses Filogenéticas

As sequências do rRNA 28S foram obtidas a partir do *GenBank* e posteriormente alinhadas utilizando o programa Muscle (Edgar 2004), após o qual foi feita uma inspeção visual, com o auxílio do programa MEGA 4.0. (Tamura *et al.* 2007).

A hipótese filogenética foi construída utilizando a *IB*, com o auxílio do programa MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist 2001). O programa MrModelTest (Nylander 2004) foi utilizado para determinar quais parâmetros deveriam ser calculados pelo MrBayes. Foram realizadas 10.000.000 gerações com duas corridas, cada uma contendo uma cadeia fria e três cadeias quentes. Como as cadeias convergiram rapidamente, 25% das primeiras topologias geradas foram descartadas para o cálculo da árvore consenso e dos tamanhos de ramos, que foi utilizada como base para todas as análises do presente trabalho.

O Monofiletismo de Zygoptera

A árvore filogenética apresentada neste trabalho foi construída de forma que a subordem Zygoptera aparecesse como um grupo monofilético, conforme sugerido por trabalhos recentes (Bechly 1996, Rehn 2003, Bybee *et al.* 2008 e Carle *et al.* 2008). A questão envolvendo o monofiletismo da subordem é bastante controversa. Alguns trabalhos sugerem o parafiletismo de Zygoptera, no entanto, estes trabalhos ou são muito antigos, e, portanto precedem os métodos de sistemática filogenética sugeridos por Hennig (1966), como é o caso do trabalho de Fraser (1957); ou incluíram um pequeno número de espécies (Saux *et al.* 2003, Hasegawa & Kasuya 2006). Com isso, a hipótese do monofiletismo de Zygoptera pareceu ser mais razoável e foi utilizada como pressuposto do presente trabalho, que, portanto, incluiu apenas uma família dentro de Epirocta, mais especificamente três espécies de Libellulidae, como grupo externo.

Reconstrução do Estado Ancestral e Análise Comparativa

Das 20 espécies utilizadas no presente trabalho (Tabela 3), sete apresentam comportamento de pouso com asas abertas, 13 apresentam comportamento de pouso com asas fechadas, 14 apresentam tipo de forrageio *sallier* e cinco apresentam o tipo *gleaner*. O gênero *Pseudagrion* é conhecido por apresentar os dois tipos de forrageio, e, para efeitos de análise, foi considerado como dado ambíguo, para evitar desvios.

As informações relativas ao modo de pouso e tipo de forrageio das espécies foram adquiridas no trabalho de Paulson (2004), sendo $x = 0$ (asas fechadas), $x = 1$ (asas abertas), $y = 0$ (*gleaner*) e $y = 1$ (*sallier*). Essas informações foram inseridas na hipótese filogenética obtida para que os estados dos nós ancestrais fossem estimados no programa Discrete do pacote BayesTraits (Pagel & Meade, 2006a).

O BayesTraits é um pacote computacional utilizado para analisar a evolução de caracteres em grupos de espécies filogeneticamente relacionadas. Uma vez que o resultado final da *IB* é uma árvore consenso do conjunto de melhores árvores encontradas pelo método, o BayesTraits avalia a evolução dos caracteres em estudo a partir de um conjunto de árvores, o que permite avaliar as politomias encontradas de maneira a considerar todas as possibilidades. Foram então utilizadas as 500 melhores árvores obtidas pela *IB*. As corridas foram feitas por *MCMC*, tendo como resultados as médias harmônicas.

Tabela 3: Sequências das espécies utilizadas, obtidas no *GenBank*, indicando família, modo de pouso, tipo de forrageio e número de acesso. Os dados comportamentais foram retirados de Paulson (2004).

Família	Espécie	modo de pouso	tipo de forrageio	Acesso NCBI
Diphlebiidae	<i>Diphlebia coerulescens</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	FJ009945
	<i>Philoganga vetusta</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	EU055308
Calopterygidae	<i>Calopteryx amata</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	FJ009949
	<i>Hetaerina americana</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	FJ009952
Coenagrionidae	<i>Argia moesta</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	FJ009939
	<i>Argia nahuana</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	EU055319
	<i>Austroagrion watsoni</i>	<i>PAF</i>	<i>G</i>	FJ009938
	<i>Enallagma</i> sp.	<i>PAF</i>	<i>G</i>	EU055235
	<i>Ishnura barberi</i>	<i>PAF</i>	<i>G</i>	EU055231
	<i>Pseudagrion aureofrons</i>	<i>PAF</i>	-	EU055256
Isostictidae	<i>Rhadinosticta simplex</i>	<i>PAF</i>	<i>G</i>	EU055249
Lestidae	<i>Archilestes grandis</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	FJ009954
	<i>Austrolestes annulosus</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	EU055255
	<i>Lestes rectangularis</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	FJ009953
	<i>Sympecma paedisca</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	EU055289
Megapodagrionidae	<i>Austroargiolestes icteromelas</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	EU055234
	<i>Heteragrion</i> sp.	<i>PAA</i>	<i>S</i>	EU055311
Platystictidae	<i>Protosticta sanguinostigma</i>	<i>PAF</i>	<i>S</i>	EU055293
Pseudostigmatidae	<i>Pseudostigma aberrans</i>	<i>PAF</i>	<i>G</i>	FJ009934
Synlestidae	<i>Synlestes weyersii</i>	<i>PAA</i>	<i>S</i>	FJ009955
Libellulidae	<i>Brachydiplax denticauda</i>	<i>PAA</i>	-	EU055265
	<i>Tramea lacerata</i>	<i>PAA</i>	-	EU055269
	<i>Trithemis aurora</i>	<i>PAA</i>	-	EU055301

PAA = pouso de asas abertas; *PAF* = pouso de asas fechadas, *S* = sallier, *G* = Gleaner.

Para inferir o melhor modelo a ser utilizado na análise, foram realizadas várias análises preliminares, que foram comparadas em função da distribuição das probabilidades posteriores pelo *BayesFactor*. O modelo *a priori* escolhido tem distribuição normal com *ratedev*=50 e aceitação dos parâmetros de 20%. Foram feitas 100.000.000 de

replicações com um *burn-in* de 1.000.000. As análises mostraram também que $q_{13} = q_{31} = q_{43} = 0$ (ver tabela 4).

Uma vez definido o modelo a ser utilizado nas análises, os estados dos dois caracteres dos nós ancestrais foram estimados pelo método do ancestral comum mais recente (*MRCA - most recent common ancestor*), também implementado no programa BayesTraits. Por este método, é atribuído um valor de verossimilhança para cada estado ancestral possível (0 ou 1 em cada um dos caracteres). As verossimilhanças são comparadas através do *LR*, e uma diferença maior que 2 sugere que um dos estados é mais provável que o outro (ver “métodos comparativos” na parte introdutória da dissertação). Esta estimativa foi feita nas 500 melhores árvores obtidas pelo MrBayes, e um estado foi considerado mais provável que o outro se $|\overline{LR}| \geq |2|$ (se a média dos LR das 500 árvores consideradas for maior ou igual a 2, em módulo) (Pagel & Meade 2006b).

Tabela 4: Modelo Dependente, apresentando as taxas de transições entre os estados dos caracteres, onde q_{12} : $x(0 \rightarrow 0), y(0 \rightarrow 1)$; q_{13} : $x(0 \rightarrow 1), y(0 \rightarrow 0)$; q_{21} : $x(0 \rightarrow 0), y(1 \rightarrow 0)$; q_{24} : $x(0 \rightarrow 1), y(1 \rightarrow 1)$; q_{31} : $x(1 \rightarrow 0), y(0 \rightarrow 0)$; q_{34} : $x(1 \rightarrow 1), y(0 \rightarrow 1)$; q_{42} : $x(1 \rightarrow 0), y(1 \rightarrow 1)$ e q_{43} : $x(1 \rightarrow 1), y(1 \rightarrow 0)$. As taxas onde as mudanças foram simultâneas não foram consideradas. $x = 0$ (pouso com asas fechadas), $x = 1$ (pouso com asas abertas), $y = 0$ (*gleaner*), $y = 1$ (*sallier*).

Estado	0,0	0,1	1,0	1,1
0,0	-	q_{12}	q_{13}	
0,1	q_{21}	-	-	q_{24}
1,0	q_{31}	-	-	q_{34}
1,1	-	q_{42}	q_{43}	-

Para testar se as taxas são de fato independentes, ou seja, se x pode modificar de 0 para 1 independentemente do estado de y , é necessário verificar se a probabilidade de, por exemplo, $x(0 \rightarrow 1)$ quando $y(0 \rightarrow 0)$ é igual à probabilidade de $x(0 \rightarrow 1)$ quando $y(1 \rightarrow 1)$, o que equivale a testar H_1 , ou se $q_{13} = q_{24}$. O teste em questão visa verificar se é possível modificar a posição da asa durante o pouso de fechada para aberta qualquer

que seja o comportamento de forrageio. Caso estas taxas sejam diferentes, a modificação de x de 0 para 1 é dependente do estado de y (0 ou 1), ou seja, o comportamento de pouso é dependente do comportamento de forrageio. Caso contrário, é independente. Para testar esta hipótese, é necessário calcular a distribuição da probabilidade posterior do modelo que tem os oito parâmetros apresentados na tabela 4, e calcular a distribuição da probabilidade posterior do modelo com sete parâmetros, no qual $q_{13} = q_{24}$. Se o $BF > 3$, modificar o comportamento de pouso de asas fechadas para abertas está condicionado ao comportamento de forrageio e portanto os caracteres são dependentes.

Além desta, foram testadas outras hipóteses:

i. H₂ O tipo de forrageio pode mudar de *gleaner* para *sallier* $y(0 \rightarrow 1)$ independente do modo de pouso, ou seja, $q_{12} = q_{34}$.

ii. H₃ O modo de pouso pode mudar de asa aberta para asa fechada independente do tipo de forrageio, ou seja $q_{31} = q_{42}$.

iii. H₄ O tipo de forrageio pode mudar de *sallier* para *gleaner*, independente do modo de pouso, ou seja: $q_{21} = q_{43}$.

Resultados

Inferência Filogenética

O alinhamento das sequências do gene ribossomal nuclear RNA 28S resultou em 3.893 sítios alinhados, dos quais 676 são variáveis. A figura 9 mostra as relações filogenéticas encontradas entre as espécies estudadas, tendo três espécies de Libellulidae como *outgroup*. Depois desta separação, Zygoptera se dividiu em dois grupos bem sustentados, o primeiro contendo espécies das famílias Lestidae, que apresentou monofiletismo, e Synlestidae, e o segundo contendo o restante das famílias.

Calopterygidae também apresentou monofiletismo, o que também foi encontrado por Misof *et al.* (2000). Todos os representantes da família Coenagrionidae foram agrupados em um grupo bem sustentado, porém com a inclusão de *Pseudostigma aberrans* (Pseudostigmatidae). Houve também a formação de uma politomia contendo: *Philoganga vetusta*, *Protosticta sanguinostigma*, *Heteragrion* sp. + *Diphlebia coerulescens* e *Rhadinosticta simplex* agrupando com Coenagrionidae + Pseudostigmatidae. Outros trabalhos também apresentam uma relação próxima para Coenagrionidae e Pseudostigmatidae (Carle *et al.* 2008)

De forma geral, os valores de probabilidade posterior foram altos, observando uma boa definição para as famílias Lestidae, Synlestidae, Isostictidae, Coenagrionidae e Calopterygidae. Como as outras famílias estão inseridas em uma politomia com baixo valor de probabilidade posterior, não há como saber ao certo sua definição de acordo com a árvore aqui apresentada.

Reconstrução de Ancestral e Análise Comparativa

No teste de correlação entre os caracteres, o modelo que melhor explicou os dados foi o de evolução dependente, aceitando-se assim a correlação dos caracteres. Portanto, todas as análises foram feitas com modelos dependentes. As análises preliminares indicaram que algumas transições são improváveis de ocorrer, como as representadas pelas taxas q13, q31, q43.

Os resultados obtidos para cada estado ancestral de cada nó foram representados em histogramas (Figura 10). Os resultados sugerem que o ancestral comum entre Zygoptera e Epiprocta pousava com as asas abertas e forrageava como um *gleaner* (nó 20). O nó 17, ancestral dos Zygoptera, forrageava como um *sallier*, e ainda pousava de asas abertas. A partir daí, houve uma modificação no nó 3, no qual o comportamento de pouso passou a ser de asas fechadas, com retorno do pouso com asas abertas no nó 1. O pouso de asas fechadas surgiu pelo menos mais duas vezes, no nó 5 e no nó 13, sem

retorno para asas abertas. A mudança do forrageio para o tipo *gleaner* ocorreu uma única vez, no nó 13, com retorno para o tipo *sallier* no nó 7.

Os testes de hipóteses a respeito das taxas instantâneas de transição entre estados de caracteres para comportamento de pouso (*PAF* ou *PAA*) e comportamento de forrageio (*gleaner* ou *sallier*) mostraram que (Figura 11 e Tabela 5):

- i. $q_{12} = q_{34}$, ou seja, modificações do modo de forrageio *gleaner* para *sallier* independem do modo de pouso. Isso foi evidenciado por um valor de *BF* de 0,013, que significa que um modelo com duas taxas diferentes para q_{12} e q_{34} não é significativamente melhor que o modelo com as duas taxas iguais.
- ii. $q_{31} = q_{42}$, ou seja, modificar o pouso de *PAA* para *PAF* independe do comportamento de forrageio. Este resultado também foi evidenciado por um valor de *BF* positivo, 2,414; mas não significativo (se o resultado fosse >3.0 , as taxas poderiam ser consideradas diferentes)
- iii. $q_{21} > q_{43}$, ou seja, é mais provável modificar o comportamento de *sallier* para *gleaner* quando a espécie pousa com as asas fechadas. O *BF* para esta estimativa foi positivo e significativo ($BF = 53.837,4$). Considerando que as análises preliminares sugerem que $q_{43} = 0$, a transição de *sallier* para *gleaner* jamais ocorreu quando a espécie pousava de asas abertas.
- iv. $q_{24} > q_{13}$, ou seja, é mais provável mudar o comportamento de *PAF* para *PAA* quando o comportamento de forrageio é do tipo *sallier*. ($BF = 14,793$ - positivo e significativo). Considerando que as análises preliminares sugerem que $q_{13} = 0$, a transição de *PAF* para *PAA* jamais ocorreu quando o comportamento de forrageio era do tipo *gleaner*.

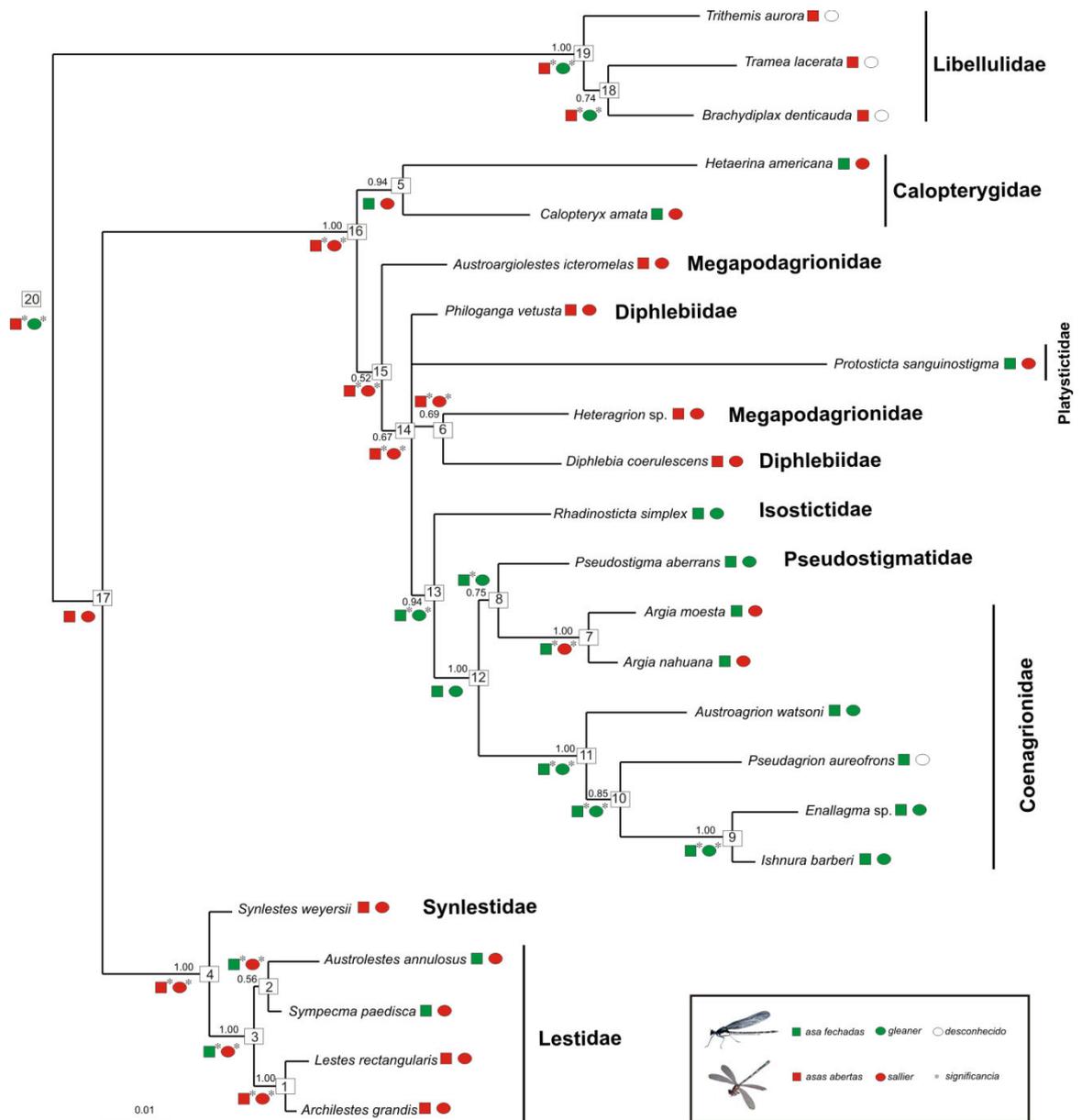


Figura 9: Árvore filogenética obtida a partir da Análise *Bayesiana*. Os valores ao lado dos nós da árvore correspondem à probabilidade posterior. Os números dentro dos quadrados nos nós internos são os identificadores de cada nó. Quadrados e círculos coloridos ao lado de cada espécie e cada nó correspondem aos estados do comportamento de pouso e forrageio, respectivamente. O asterisco ao lado de um quadrado ou círculo indica que a verossimilhança de um estado é significativamente maior que o do outro. Quadrado verde: pouso com asas fechadas, quadrado vermelho: pouso com asas abertas. Círculo verde: comportamento de forrageio *gleaner*, círculo vermelho: comportamento de forrageio do tipo *sallier*, círculo branco: comportamento de forrageio desconhecido.

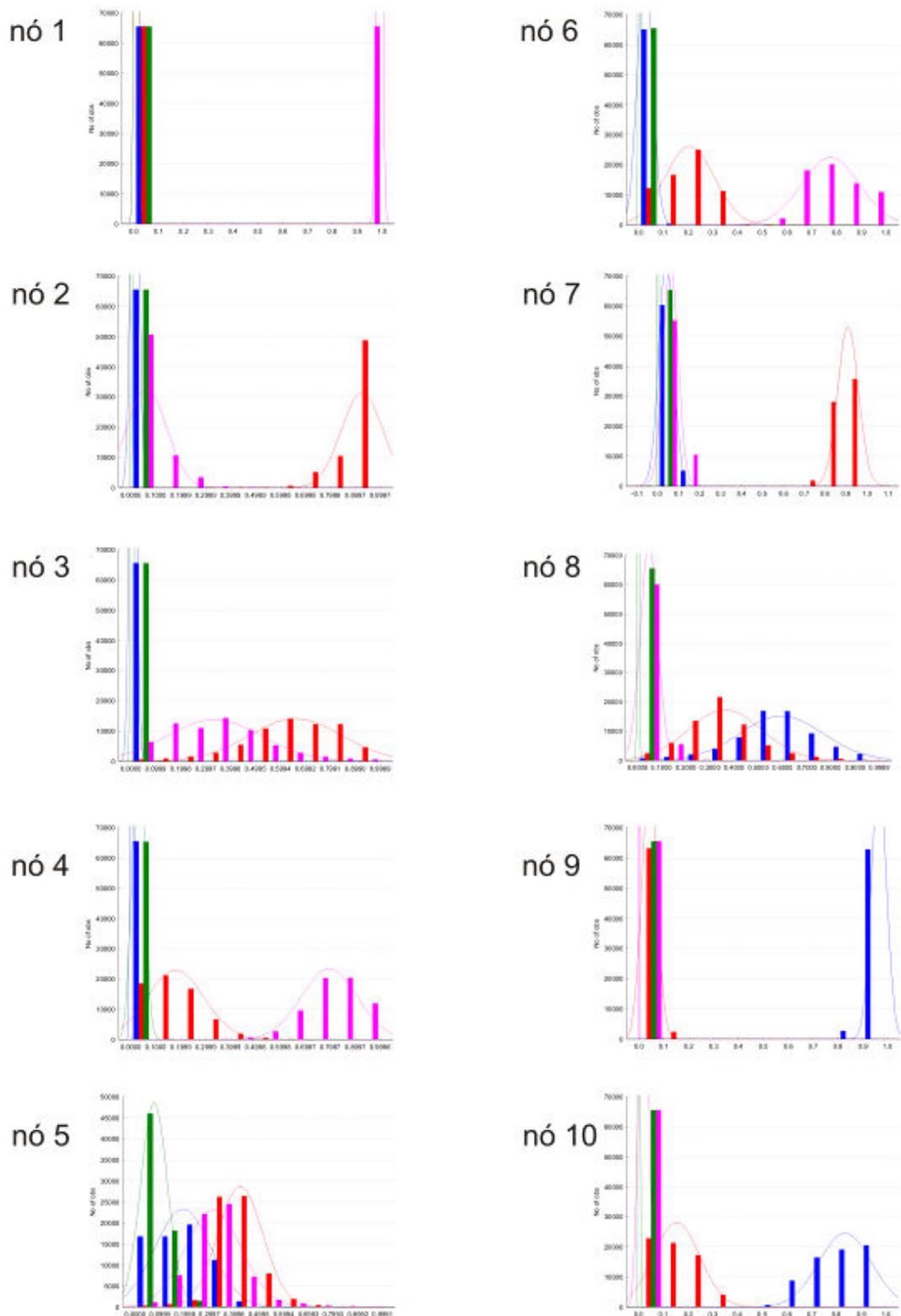


Figura 10: Distribuição das probabilidades posteriores da inferência ancestral dos nós internos da árvore representada na figura 9. Cada combinação de estados de caracteres foi representada por uma cor diferente, sendo azul $x = 0$ e $y = 0$; vermelho $x = 0$ e $y = 1$; verde $x = 1$ e $y = 0$; e rosa $x = 1$ e $y = 1$. Quanto mais para a direita, maior a probabilidade posterior de uma determinada combinação de caracteres para cada nó. ($x = 0$: pouso com asas fechadas; $x = 1$: pouso com asas abertas; $y = 0$: forrageio do tipo *gleaner*; $y = 1$: forrageio do tipo *sallier*).

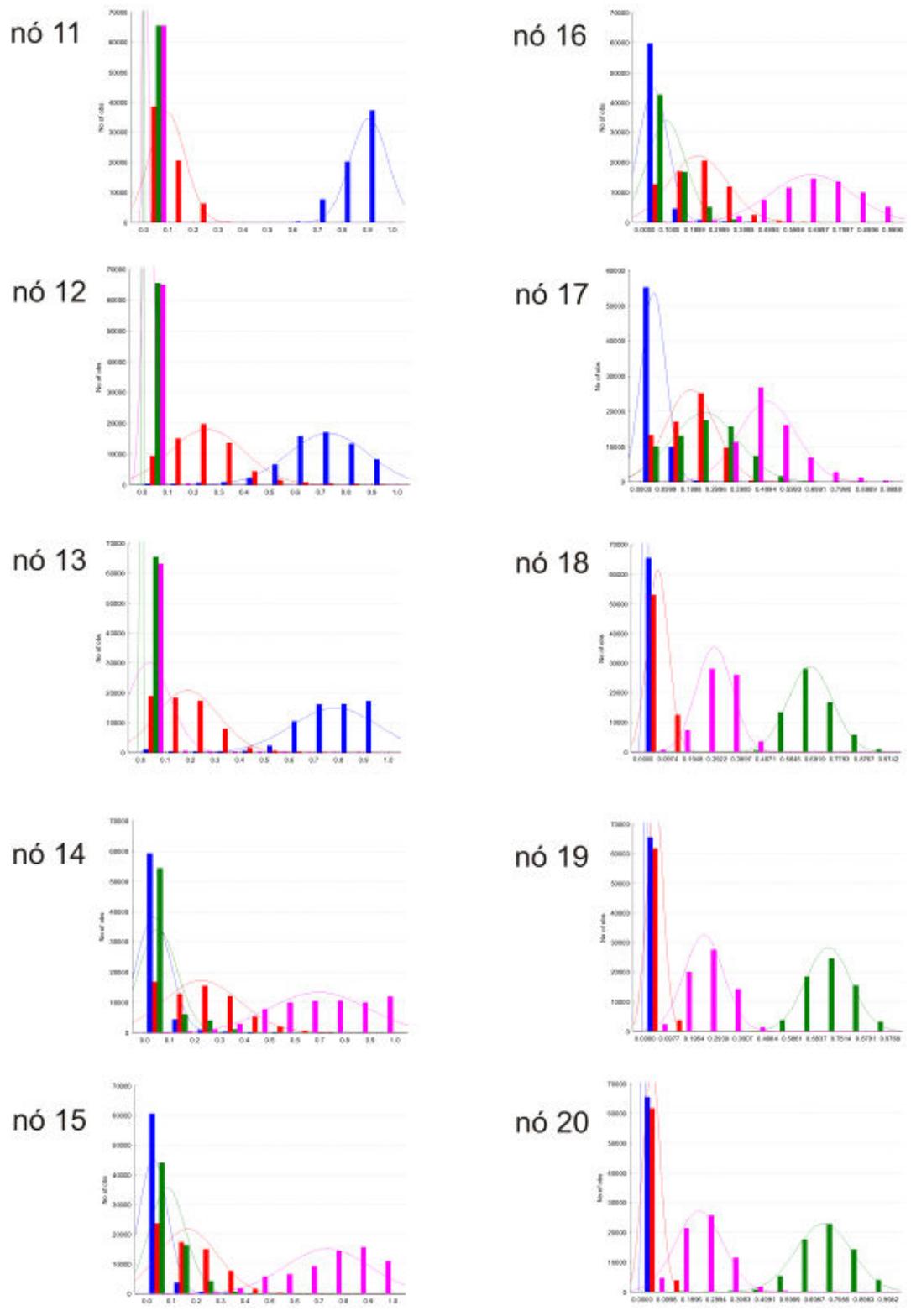


Figura 10 – Continuação.

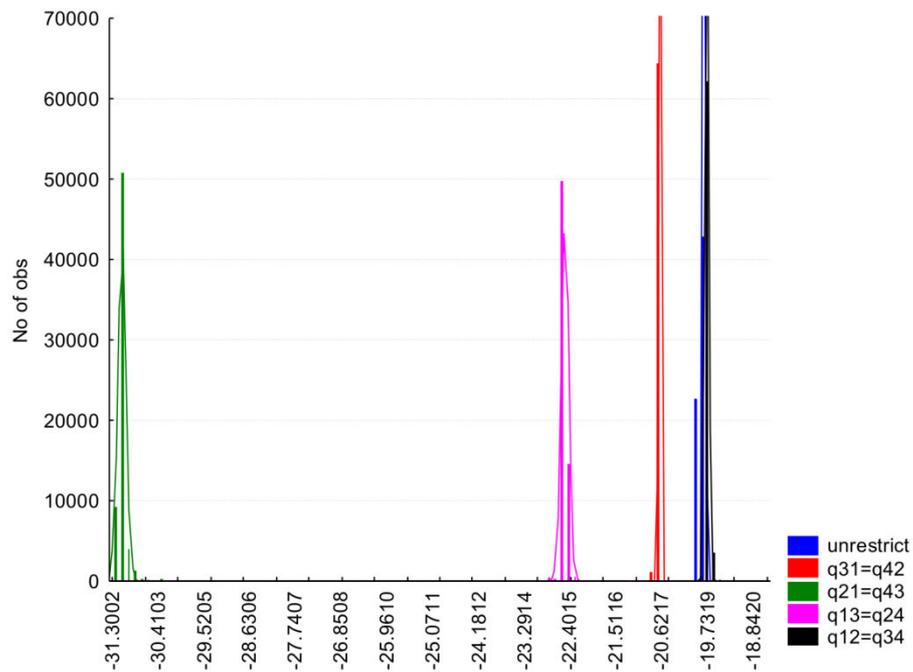


Figura 11: Log da verossimilhança de diferentes combinações de taxas de transição. a) azul: unrestrict: sem restrições, todas as taxas são independentes. b) Vermelho ($q_{31} = q_{42}$): modo de pouso pode mudar de asa aberta para fechada independente do tipo de forrageio. c) Verde ($q_{21} = q_{43}$): o tipo de forrageio pode mudar de *sallier* para *gleaner* independente do modo de pouso. d) Rosa ($q_{13} = q_{24}$): o modo de pouso pode mudar de asa fechada para asa aberta independente do tipo de forrageio. e) Preto ($q_{12} = q_{34}$): o tipo de forrageio pode mudar de *gleaner* para *sallier* independente do modo de pouso.

Tabela 5: Teste de hipóteses, apresentando os pressupostos, os modelos e os valores do *Bayes Factors* encontrados.

Hipótese	Pressuposto	modelo	BF
H ₁	Mudança de asa fechada para asa aberta, independente do tipo de forrageio	$q_{13} = q_{24}$	14,793
H ₂	Mudança de <i>gleaner</i> para <i>sallier</i> , independente do modo de pouso	$q_{12} = q_{34}$	0,013
H ₃	Mudança de asa aberta para asa fechada, independente do tipo de forrageio	$q_{31} = q_{42}$	2,414
H ₄	Mudança de <i>sallier</i> para <i>gleaner</i> , independente do modo de pouso	$q_{21} = q_{43}$	53.837,4

Discussão

Inércia Filogenética

A primeira questão a ser discutida em face aos resultados apresentados seria uma resposta à pergunta de Paulson (2004): “Porque alguns zigópteras pousam com asas abertas?” A resposta, em parte, é bastante simples: por causa da ancestralidade, o que está diretamente relacionado à questão da inércia filogenética.

A hipótese de inércia filogenética (*PIH*) (Heymer 1975) sugere que o comportamento de pouso com asas abertas é simplesmente a manutenção, não adaptativa, da condição ancestral. Paulson (2004) refutou essa hipótese, pois gêneros *PAA* são encontrados no mínimo em cinco famílias de Zygoptera (Amphipterygidae, Euphacidae, Les-tidae, Synlestidae e Megapodagrionidae) e por isso há uma necessidade de explicações adaptativas para esse comportamento. No entanto, Paulson (2004) rejeitou a *PIH* sem utilizar uma abordagem filogenética e sem definir o termo inércia filogenética.

O termo inércia filogenética não é amplamente adotado. As discussões em evolução são feitas sobre restrições, e a relação entre inércia e restrição não é clara. Uma definição consenso de livros-texto de evolução para restrições pode ser: “uma propriedade de uma característica que, apesar de possivelmente adaptativa no ambiente em que originalmente surgiu, atua limitando a produção de novas variantes fenotípicas (Blomberg & Garland 2002).

A hipótese filogenética mostrada neste trabalho sugere forte sinal filogenético para a posição das asas durante o pouso, com apenas três transições entre pouso com asas abertas para pouso com asas fechadas, que ocorreram do nó 4 para o 3, do 16 para o 5 e do 14 para o 13; e uma transição de fechada para aberta, do nó 3 para o nó 1 (ver figura 9). Deve ser levado em consideração que isso totaliza quatro mudanças, numa árvore que permitiria 17. Uma restrição mais intensa é verificada quando o tipo de for-

rageio é considerado, sendo verificada uma transição de *gleaner* para *sallier* (do nó 8 para o 7); e uma transição de *sallier* para *gleaner*, do nó 14 para o 13. Portanto, há uma forte indicação de ter havido restrições na história evolutiva dessas espécies, o que está de acordo com a hipótese de inércia filogenética.

Novas hipóteses a serem testadas

Asas Abertas Permitem Respostas Rápidas?

A hipótese da resposta rápida (*QTH*), sugerida por Paulson (2004), prediz que a posição de pouso com asas abertas facilita uma saída mais rápida e um melhor ajuste na orientação do vôo, e que espécies com pouso de asas abertas (*PAA*) apresentariam forrageio do tipo *sallier* e aquelas *PAF* do tipo *gleaner*. Com isso, *salliers* seriam mais ágeis e *gleaners* mais lentos. Porém Paulson (2004) chegou apenas à conclusão de que não há evidências que refutem sua hipótese. Samways (2006) apóia a *QTH*, porém afirma que a resposta rápida não é ajustada pelo forrageio e sim por defesa territorial.

De acordo com os resultados aqui apresentados, estudando as taxas de transição entre os estados de caracteres dos dois tipos de comportamento: modo de pouso e tipo de forrageio, foi possível detectar uma forte restrição contra o forrageio do tipo *gleaner*, que só é apresentado por espécies *PAF*. Espécies *PAA*, conforme já mencionado por Paulson (2004), só apresentam forrageio do tipo *sallier*. No entanto, este resultado não significa que espécies *PAA* forrageiam por senta-espera (*sallier*) mais frequentemente do que espécies *PAF*, conforme discutido por Reinhardt (2006), que sugeriu que a predição deve ser o inverso daquela dada por Paulson: se pousar com asas abertas oferecer benefícios para o forrageio do tipo *sallier*, indivíduos *salliers* irão apresentar pouso com asas abertas mais frequentemente do que *gleaners*, e não necessariamente espécies *PAA* apresentarão tipo de forrageio *sallier* mais frequentemente do que espécies *PAF*.

Portanto, os resultados aqui apresentados não suportam a hipótese de que espécies que pousam de asas abertas tenham respostas mais rápidas que espécies que pousam de asas fechadas.

O Indivíduo Fica Menos Evidente com Asas Fechadas?

Algumas considerações podem ser feitas a partir de outra hipótese do Paulson, a *Shiny Wing Hypothesis (SWH)*, cujas previsões são:

- 1) Espécies menores são mais vulneráveis à predação, então *PAF* deve ser mais comum em espécies menores, de modo que as tornam mais crípticas;
- 2) Espécies que pousam preferencialmente em locais sombreados seriam *PAA* e as com preferências a locais ensolarados seriam *PAF*.

Partindo do princípio que predação a partir do substrato (forrageio do tipo *gleaner*) não requer respostas rápidas, é possível considerar que espécies com tipo de forrageio *sallier* sejam mais rápidas, e portanto tenham capacidade de escapar de predadores de forma mais rápida e eficiente. Partindo destes pressupostos, é possível fazer outras previsões, relacionando o comportamento de pouso com o de forrageio:

- 3) espécies com tipo de forrageio *gleaner* deveriam ser espécies *PAF* (asa fechada torna o indivíduo mais críptico, portanto a necessidade de fuga rápida diminui),
- 4) espécies com forrageio do tipo *sallier* poderiam ter ambos os modos de pouso, tanto com asas abertas quanto com asas fechadas, pois o benefício de ter uma resposta rápida permite qualquer modo de pouso.

Essas previsões estão de acordo com os resultados aqui apresentados, uma vez que foram encontradas duas restrições para as transições: *i.* não é provável modificar o comportamento de *PAF* para *PAA* se o comportamento de forrageio for *gleaner*, ou seja, espécies lentas não poderiam se expor tanto; e *ii.* não é provável mudar o comportamen-

to de *sallier* para *gleaner* se o comportamento de pouso for *PAA*, ou seja, espécies conspícuas não podem ser lentas.

Todas essas considerações estão restritas às espécies que Paulson definiu em seu trabalho como tendo comportamento de pouso com asa aberta ou com asa fechada. Reinhardt (2006) argumentou que em algumas espécies, como as pertencentes à família Coenagrionidae, é difícil definir o comportamento de pouso adotado, pois é observado um comportamento intermediário, o semi-aberto. O autor ainda discutiu que a exclusão de tais intermediários é problemática, pois algumas funções relacionadas com pouso de asas abertas, como termorregulação, irão favorecer uma maior plasticidade da posição das asas durante o pouso.

Em resposta, Paulson (2006) afirmou que não utilizou espécies que pousam com asas semi-abertas na categoria de pouso com asas abertas em seu trabalho de 2004 e afirmou que não concorda com Reinhardt (2006) sobre a dificuldade de definir o comportamento de pouso para algumas espécies. De acordo com Paulson (2006), apesar de alguns indivíduos apresentarem um comportamento de pouso com asas entreabertas, essa posição das asas não permanece mais do que alguns poucos segundos, o que não coloca em dúvida o comportamento de pouso (*PAA* ou *PAF*) adotado por cada espécie.

Respostas Rápidas e Comportamento Críptico

Assim como a maior parte dos caracteres encontrados em qualquer espécie, o comportamento de pouso, com asas abertas ou fechadas em *Zygoptera*, requer explicações complexas e dificilmente pode ser explicado através de hipóteses que considerem fatores isolados. É mais provável que deva ser explicado por uma conjunção de diferentes fatores, como a inércia filogenética, o fato de estar ou não evidente aos predadores e a velocidade das respostas.

Todos estes resultados (*i.* a *iv.*) requerem uma combinação de fatores adaptativos que estão relacionados à agilidade e à camuflagem das espécies. Se uma espécie é críptica (*PAF*), pode ter comportamento rápido ou lento (forrageio do tipo *sallier* ou *gleaner*), evidenciado pelo teste (*i.*). Do mesmo modo, se uma espécie é rápida (*sallier*), pode ser críptica (*PAF*) ou conspícua (*PAA*) (teste *ii.*). No entanto, se é lenta (*gleaner*), não pode ser conspícua, o que explica o resultado *iii.*, da mesma forma que ser for conspícua (*PAA*) não pode ser lenta (*gleaner*) (teste *iv.*).

CAPÍTULO 2 – Filogenia e Evolução de Libellulidae (Odonata) baseada em fragmentos de DNA mitocondrial

Introdução

Libellulidae é uma família considerada cosmopolita, representada por 141 gêneros e 969 espécies, sendo uma das famílias mais representativas dentro de Eiprocta (Figura 12). Essa família é facilmente reconhecida pela presença de uma alça anal mais longa que larga, em forma de pé (Figura 13). No Brasil, ocorrem 35 gêneros e aproximadamente 210 espécies (Costa *et al.* 2002; Paulson 2007), das quais 38 são endêmicas (Paulson 2007).

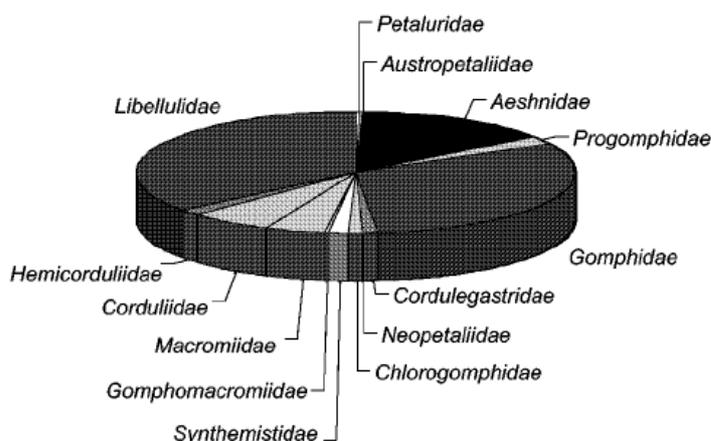


Figura 12: Riqueza relativa das famílias de Eiprocta. Retirada de Misof (2002).

A grande variabilidade presente dentro da família levou à sua subdivisão em 12 subfamílias (Fraser 1957). Esta subdivisão, no entanto, precede os métodos filogenéticos (portanto não levou em consideração homologias e sinapomorfias) e foi baseada em características de venação alar, situação típica da classificação taxonômica em toda a ordem Odonata. Mais recentemente, Bridges (1994) reduziu o número de famílias para

11, mas o trabalho se reduz a uma catalogação dos táxons dentro de Libellulidae, sem uma definição clara dos caracteres que distinguem as subfamílias.

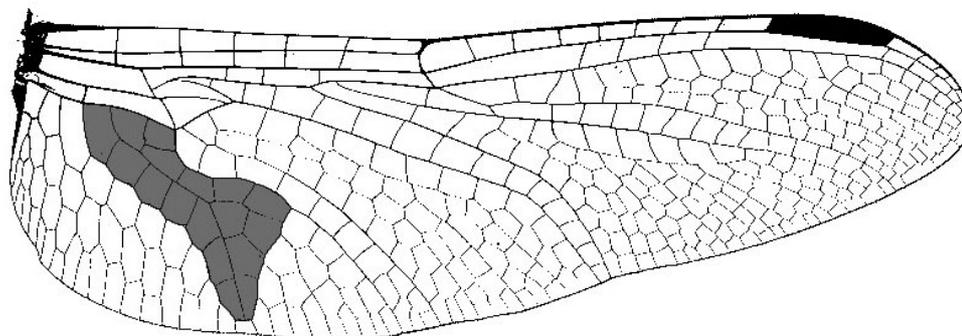


Figura 13: Asa posterior de Libellulidae realçando a alça anal em forma de pé. Retirada de www.sonic.net.

Histórico taxonômico de Odonata

Linnaeus (1758) identificou as primeiras espécies da ordem Odonata Fabricius 1793, que somavam 20 espécies, todas classificadas no gênero *Libellula*, dentro de um amplo grupo da ordem chamada Neuroptera (incluindo as ordens: Ephemeroptera, Plecoptera, Neuroptera, Mecoptera, Megaloptera, Raphidioptera e Trichoptera). *Libellula depressa* foi definida como a espécie-tipo do gênero, e posteriormente da ordem.

Posteriormente, Fabricius (1775) subdividiu *Libellula* em três grupos: *i. Libellula*, formado por espécies empoleiradoras de corpo curto; *ii. Aeshna*, composto por espécies planadoras de corpo maior; e *iii. Agrion*, que incluía espécies tipicamente menores e mais delgadas. Durante o final do século 18 e início do século 19, muitos gêneros foram descritos, principalmente por Leach (1815) e Rambur (1842). A ordem Odonata permaneceu dentro do amplo conceito lineano da ordem Neuroptera até 1923, quando Martynov dividiu os insetos alados em dois grandes grupos: Neoptera e Paleoptera. O primeiro é bem aceito como um grupo monofilético atualmente, mas o status de Paleop-

tera, que compreende Odonata, Ephemeroptera e outras ordens extintas, tem sido muito debatido.

O entomólogo Edmund de Selys-Longchamps (Selys), no século 19, descreveu mais de 1000 espécies de Odonata e seu mais notável trabalho foi a criação do primeiro sistema de classificação desta ordem. O sistema Selysiano se baseava em uma classificação bastante incomum, que reunia espécies em gêneros e estes em “legiões”, uma categoria criada por Selys. Enquanto a taxonomia de outros grupos de insetos foi padronizada em terminologias baseadas em gêneros, famílias e ordens, Odonata adquiriu uma nomenclatura própria. Hoje, cada “legião” de Selys corresponde aproximadamente às famílias ou superfamílias da nomenclatura padrão. Selys introduziu ainda os termos Anisoptera e Zygoptera.

O sistema de classificação proposto por Selys se baseou principalmente nos complexos padrões de venação das asas. Para tanto, Selys criou uma detalhada nomenclatura para as veias alares que se aplicam apenas às asas de Odonata, sem relação com as veias alares de outros insetos. Outros autores também estudaram a classificação da ordem Odonata, também utilizando os padrões de veias alares. A maioria destes trabalhos é anterior aos métodos propostos por Hennig (1966), como Comstock & Needham (1898), Tillyard (1917), Tillyard & Fraser (1938) e Fraser (1957). Algumas revisões mais recentes adotaram métodos cladísticos propostos por Hennig (1966), como Bechly (1996), Trueman (1996) e Rehn (2003).

Trueman (2007) fez uma revisão de todo o histórico da classificação de Odonata e concluiu que a decisão por qualquer sistema de classificação só poderá ser feita após a resolução do problema Paleoptera e das relações entre subordens de Odonata.

Relações filogenéticas dentro de Libellulidae

Estudos moleculares sustentam o monofiletismo da superfamília Libelluloidea (Fleck *et al.* 2008b, Misof *et al.* 2001, Saux *et al.* 2003), que compreende quatro famílias: Gomphomacromiidae, Macromiidae, Corduliidae e Libellulidae (Ware *et al.* 2007). Filogenias utilizando caracteres morfológicos, principalmente aqueles relacionados à venação alar, sustentam o monofiletismo da família Libellulidae (Trueman 1996, Rensde 2005, Bybee *et al.* 2008). No entanto, a subdivisão em subfamílias ainda é obscura, pois é definida por poucos caracteres de nervuras, dos quais não constam sinapomorfias. Praticamente toda a classificação de Odonata envolve caracteres de venação, desde a classificação de fósseis (Figura 14), até a de espécies atuais. Porém, muitos destes caracteres são considerados homoplásticos (Pilgrim & Von Dohlen 2008, Fleck *et al.* 2008b), o que pode resultar em atribuições errôneas.

Filogenias baseadas em dados moleculares reforçam o monofiletismo da família Libellulidae (Misof *et al.* 2001, Bechly 2002, Saux *et al.* 2003, Ware *et al.* 2007). Porém, das 11 subfamílias descritas, estes dados só suportam o monofiletismo da subfamília Libellulinae (Pilgrim & Von Dohlen 2008). Este resultado pode estar relacionado ao fato de que as subfamílias de Libellulidae não serem táxons naturais ou simplesmente decorrer da subamostragem de espécies, uma vez que muitos dos gêneros endêmicos do Brasil e da América do Sul não foram amostrados.

Outro fator que pode prejudicar a obtenção de filogenias bem resolvidas é a possibilidade do táxon em estudo ter sobrevivido a grandes extinções, seguidos de períodos de radiação adaptativa, que também podem ter ocorrido por alterações ambientais que podem ter aumentado ou diminuído o número de espécies, contribuindo para a falta de resolução atual. Para que se possa inferir este tipo de efeito nas filogenias, é necessário obter uma boa datação dos eventos de especiação dentro da família Libellulidae. Estima-se que a família tenha surgido no Cretáceo (131,5 a 94,5 milhões de anos atrás –

MAA) (Fleck *et al.* 1999), período crucial para o desenvolvimento de angiospermas, com maiores mudanças na vegetação de ambientes aquáticos, o que pode ter favorecido mudanças importantes na fauna de Odonata (Kalkman *et al.* 2008). Ware *et al.* 2008, utilizando estimativas do relógio molecular, restringiram um pouco mais esta estimativa, e inferiram que a família pode ter surgido há 57,7 MAA ou há 86,6 MAA. No entanto, estes autores utilizaram apenas uma parte dos registros fósseis disponíveis na literatura, o que pode ter prejudicado suas conclusões e feito com que as estimativas estejam subestimadas.

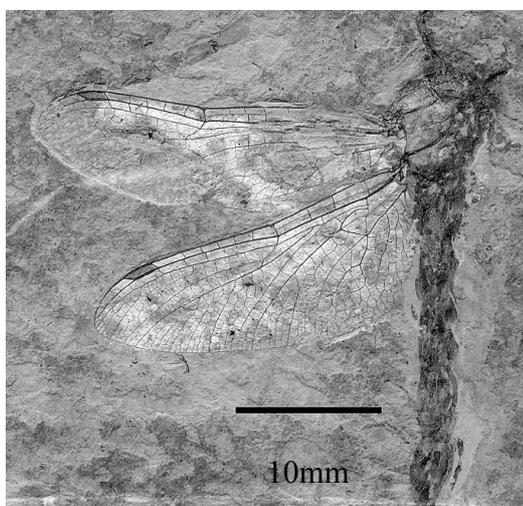


Figura 14: *Rencordulia sinica* (Araripelibellulidae), espécie fóssil descrita basicamente por caracteres de venação alar, devido à melhor preservação das asas do que do corpo. Retirada de Fleck *et al.* (2008c).

O principal objetivo do presente trabalho foi construir uma hipótese filogenética mais abrangente para a família Libellulidae, incluindo sequências de espécies já representadas em outras hipóteses filogenéticas, bem como novas sequências, de espécies que ocorrem no Brasil, na tentativa de obter uma melhor resolução das relações entre suas subfamílias e uma melhor compreensão da evolução do grupo. Baseada nesta hipótese filogenética, foram feitas estimativas dos tempos de divergência entre os membros da família Libellulidae, através do relógio molecular, no sentido de tentar compreender os padrões evolutivos encontrados nesta e em outras inferências filogenéticas envolvendo a família.

Material e Métodos

Coleta do material biológico

A tabela 6 mostra as 25 espécies coletadas para este trabalho. A coleta foi realizada em quatro localidades diferentes:

- * Parque Estadual do Rio Doce (*PERD*), Minas Gerais.
- * Rio São Bartolomeu, localizado nas proximidades de Viçosa-MG.
- * 3 localidades do estado do Espírito Santo: Vitória, Vila Velha, e Santa Teresa.
- * Belém, Pará.

As coletas foram concentradas no período das 10 às 14 horas, horário de maior atividade das espécies (De Marco & Resende 2002), e consistiram na captura ativa por meio de redes entomológicas. Sempre que possível, foram coletados três indivíduos por espécie, sendo um deles preparado em acetona *PA* para ser depositado como material testemunho em coleções entomológicas. Os demais foram preservados em etanol absoluto para a posterior extração do DNA total.

A escolha destas 25 espécies foi feita em função da abundância das mesmas nos locais onde foram coletadas e pela facilidade de acesso a estes locais. O material utilizado para a padronização das técnicas no laboratório (extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos fragmentos) foi coletado no entorno do município de Viçosa.

Escolha da sequência gênica

Por se tratar da construção da filogenia de uma família pouco explorada em termos filogenéticos, é impossível estabelecer *a priori* se os gêneros dentro de Libellulidae são predominantemente próximos ou distantes. Para tentar definir as relações filogenéticas dentro do grupo e garantir a eficiência da busca em quaisquer níveis de similaridade entre as espécies a serem amostradas, foi feita uma busca prévia no *GenBank* por sequências de fragmentos de DNA de espécies de Libellulidae disponíveis. Dentre as se-

quências disponíveis, a que apresentava a maior representatividade em termos de número de espécies por gênero e subfamília foi um fragmento de DNA mitocondrial, que inclui parte do RNA ribossomal 12S, o RNA transportador da Valina e parte do RNA ribossomal 16S (rRNA 12S-16S) (Tabela 7).

Com isso, o presente trabalho inclui seis gêneros ainda não representados no *GenBank*: *Oligoclada* (Brachydiplactinae), *Planiplax* (Leucorrhinae), *Diastatops* (Palpopleurinae), *Idiataphe*, *Tauriphila* (Trameinae) e *Elasmothemis* (Trithemistinae). Foram incluídas na análise, como grupo irmão, espécies da família Corduliidae, que é classificada junto com Libellulidae na superfamília Cavilabiata (Misof 2002, Pilgrim & Von Dohlen 2008), e uma espécie de Gomphidae.

Extração do DNA

A extração do DNA total foi feita logo após cada coleta e foi utilizado o protocolo padrão de extração com Fenol-Clorofórmio-álcool isoamílico recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997), com adaptações na temperatura de incubação das amostras e na utilização de fenol-clorofórmio.

Em uma primeira etapa, a cabeça e o tórax de cada indivíduo foram macerados em graal de porcelana, ou em microtubo de 2,0 ml (*ependorf*) contendo 800 - 1000µl de tampão de extração gelado: CTAB 2% (Hexadecil Trimetil Brometo de Amônio); EDTA (Ácido Tetraacético Diamina Etileno) 20 mM (pH 8,0); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), água Milli-Q e 100 µg/ml de protease. O macerado foi incubado a 55°C por 30 minutos. A desproteíntização foi feita em dois passos, o primeiro deles com um volume de fenol-clorofórmio (1:1), seguido de uma nova desproteíntização com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

Após cada desproteíntização, o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm por 8 minutos em uma centrífuga Eppendorf 5415C. A precipitação do ácido nucléico foi feita

com um volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por 24 horas. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 *rpm* por 30 minutos e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O ácido nucléico foi ressuspensão em 100 μl de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio, para verificar a integridade, pureza e quantificar o DNA extraído. Em uma segunda etapa, todos os procedimentos acima descritos foram realizados utilizando apenas o músculo torácico, para verificar a possibilidade de inibidores contidos no exoesqueleto desses animais. Finalizando, o DNA extraído foi armazenado em congelador a -80°C .

Amplificação do DNA

Foram utilizados seis *primers* para a amplificação e sequenciamento do fragmento rRNA 12S-16S (Tabela 8). Resultados anteriores obtidos no laboratório mostraram que é necessário o uso de diferentes *primers* para tentar amplificar sequências de DNA de diferentes espécies da família, portanto as condições de PCR foram otimizadas para cada uma das espécies. As condições para a amplificação foram padronizadas a partir dos protocolos descritos em Yamauchi *et al.* (2004) e Pilgrim & Von Dohlen (2008), com modificações na concentração dos componentes da reação de amplificação e do programa de amplificação.

Tabela 6: Espécies coletadas, utilizadas no presente trabalho, e suas respectivas subfamílias e localidades em que foram coletadas.

Sub-família	Espécie	Localidade
Brachydiplacinae	<i>Micrathyria artemis</i>	Viçosa-MG
	<i>Micrathyria catenata</i>	Timóteo-MG
	<i>Micrathyria hesperis</i>	Santa Teresa-ES
	<i>Micrathyria spuria</i>	Timóteo-MG
	<i>Nephepeltia phryne</i>	Caratinga-MG
Leucorrhinae	<i>Brachymesia cf furcata</i>	Caratinga-MG
	<i>Brachymesia herbida</i>	Caratinga-MG
	<i>Planiplax phoenicura</i>	Caratinga-MG
Libellulinae	<i>Orthemis discolor</i>	Santa Teresa-ES
Palpopleurinae	<i>Diastatops obscura</i>	Caratinga-MG
	<i>Perithemis icteroptera</i>	Santa Teresa-ES
	<i>Perithemis lais</i>	Caratinga-MG
	<i>Perithemis mooma</i>	Viçosa-MG
Sympetrinae	<i>Erythemis cf phoenicura</i>	Caratinga-MG
	<i>Erythemis haematogastra</i>	Timóteo-MG
	<i>Erythemis peruviana</i>	Timóteo-MG
	<i>Erythemis vesiculosa</i>	Vila Velha-ES
	<i>Erythrodiplax basalis</i>	Belém-PA
	<i>Erythrodiplax cf ochracea</i>	Ipaba-MG
	<i>Erythrodiplax latimaculata</i>	Timóteo-MG
Trameinae	<i>Erythrodiplax media</i>	Viçosa-MG
	<i>Tramea binotata</i>	Caratinga-MG
	<i>Tauriphila xiphea</i>	Viçosa-MG
Trithemistinae	<i>Idiataphe cf amazonica</i>	Caratinga-MG
	<i>Elasmothermis cannaerioides</i>	Viçosa-MG

Após padronização, a amplificação do DNA foi feita a partir de duas soluções básicas principais, MIX-C e MIX-F (Tabela 9). A primeira foi utilizada em 20 espécies e a segunda em outras 5. Foram realizados controles negativos (com todos os reagentes, exceto o DNA) para verificar possíveis contaminações.

Tabela 7: Sequências da região rRNA 12S-16S disponíveis no *GenBank* de diferentes espécies e seus respectivos números de acesso.

Subfamília	Espécie	Nº de acesso
Brachydiplactinae	<i>Chalcostephia flavifrons</i>	EU477716
	<i>Micrathyria atra</i>	EF640386
	<i>Micrathyria didyma</i>	DQ021421
	<i>Nannothemis bella</i>	EF640388
	<i>Porpax risi</i>	EF640389
	<i>Uracis infumata</i>	EF640391
Corduliidae	<i>Cordulia aenea</i>	EU477707
	<i>Epithea bimaculata</i>	EU477708
	<i>Somatochlora flavomaculata</i>	EU477704
Gomphidae	<i>Ophiogomphus severus</i>	AF266076
	<i>Stylurus amnicola</i>	EU477657
Leucorrhininae	<i>Brachymesia gravida</i>	EF640392
	<i>Celithemis elisa</i>	EU477751
	<i>Celithemis eponina</i>	EF640393
	<i>Leucorrhinia dubia</i>	EU477718
	<i>Leucorrhinia glacialis</i>	EF640394
	<i>Leucorrhinia hudsonica</i>	EF640395
	<i>Leucorrhinia intacta</i>	EF640396
	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>	EU477752
<i>Leucorrhinia proxima</i>	EF640397	
Libellulinae	<i>Agrionoptera insignis</i>	EU477738
	<i>Cratilla metallica</i>	EU477737
	<i>Ladona depressa</i>	EU477730
	<i>Ladona fulva</i>	EU477728
	<i>Lathrecista asiatica</i>	EF640398
	<i>Libellula forensis</i>	EF640399
	<i>Libellula nodistica</i>	EF640400
	<i>Libellula quadrimaculata</i>	EU477729
	<i>Libellula saturata</i>	EF640401
	<i>Lyriothemis elegantissima</i>	EU477735
	<i>Misagria parana</i>	EU477748
	<i>Orthemis cultriformis</i>	EU477734
	<i>Orthemis ferruginea</i>	EF640402
	<i>Orthetrum albistylum</i>	EU477732
	<i>Orthetrum brunneum</i>	DQ021416
	<i>Orthetrum pruinosum</i>	EF640403
	<i>Orthetrum sabina</i>	EF640404
	<i>Oxythemis phoenicosceles</i>	EF640405
	<i>Plathemis subornata</i>	EF640406
	<i>Potamarcha congener</i>	EF640407
<i>Thermothemis madagascariensis</i>	EU477736	
Onychothemistinae	<i>Onychothemis testacea</i>	EF640408

Continuação

Subfamília	Espécie	Nº de acesso
Sympetrinae	<i>Acisoma panorpoides</i>	EF640410
	<i>Brachythemis leucosticta</i>	EF640412
	<i>Bradinyopyga cornuta</i>	EF640413
	<i>Crocothemis nigrifrons</i>	EF640415
	<i>Crocothemis servilia</i>	EF640416
	<i>Deielia phaon</i>	EF640417
	<i>Diplacodes lefebvrei</i>	EF640419
	<i>Erythrodiplax unimaculata</i>	EF640427
	<i>Nannodiplax rubra</i>	EF640428
	<i>Nesogonia blackburni</i>	EF640429
	<i>Neurothemis tullia</i>	EF640432
	<i>Pachydiplax longipennis</i>	EF640433
	<i>Philonomon luminans</i>	EF640434
	<i>Pseudoleon superbus</i>	EF640435
	<i>Rhodopygia hinei</i>	EF640437
	<i>Rhodothemis rufa</i>	EU477744
	<i>Sympetrum danae</i>	EU477740
	<i>Sympetrum fonscolombii</i>	EF640440
	<i>Sympetrum meridionale</i>	EU477742
	<i>Sympetrum obtrusum</i>	EF640443
<i>Sympetrum pedemontanum</i>	EF640444	
<i>Sympetrum sanguineum</i>	EF640445	
<i>Sympetrum vulgatum</i>	EU477739	
<i>Trithetrum navasi</i>	EF640448	
Tetrathemistinae	<i>Malgassophlebia aequatoris</i>	DQ021433
	<i>Neodythemis africana</i>	DQ021435
	<i>Notiothemis robertsi</i>	EU477725
	<i>Tetrathemis irregularis</i>	EU477726
	<i>Tetrathemis polleni</i>	DQ021430
Trameinae	<i>Miathyria marcella</i>	EF640449
	<i>Pantala flavescens</i>	EF640450
	<i>Rhyothemis imperatrix</i>	EU477720
	<i>Rhyothemis variegata</i>	EF640451
	<i>Tholymis tillarga</i>	EF640452
Trithemistinae	<i>Brechmorhoga mendax</i>	EF640453
	<i>Dythemis fugax</i>	EF640454
	<i>Paltothemis lineatipes</i>	EF640455
	<i>Trithemis arteriosa</i>	EF640456
	<i>Trithemis aurora</i>	EU477749
	<i>Trithemis cf africana</i>	EU477756
Urothemistinae	<i>Macrodiplax balteata</i>	EF640459
	<i>Macrodiplax cora</i>	EU477722
	<i>Urothemis cf signata</i>	EU477723
Zygonichinae	<i>Zygonyx iris</i>	EF640461
	<i>Zygonyx torrida</i>	EU477724

Tabela 8: *Primers* utilizados para a amplificação e seqüenciamento do fragmento

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
liblsuFa	GTAAGAGTTTAAASGTCGAACAGA	Pilgrim & Von Dohlen (2008)
libssuR	AGGATTAGATACCCTTTTATTTTAAATG	Pilgrim & Von Dohlen (2008)
16S-F	TTACGCTGTTATCCCTAA	Kambhampati & Charlton (1999)
16S-R	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Kambhampati & Charlton (1999)
lib_mtRintF	AAAATATAGAGCTTATCCCC	Pilgrim & Von Dohlen (2008)
lib ssuRa	ATAAGATAAGTCGTAACATAGTAGG	Pilgrim & Von Dohlen (2008)

O programa de amplificação consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos a 92°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto (média da temperatura de pareamento dos *primers* utilizados), e 64°C por 1,5 minuto; mais um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos, após os quais as amostras eram mantidas a 4°C até sua retirada do termociclador.

Tabela 9: Concentrações e volumes (em μ l) dos reagentes utilizados nas soluções básicas MIX C e F, utilizadas na amplificação do 12S-16S mitocondrial em diferentes espécies.

Reagente	Concentração	MIX-C	MIX-F
Tampão	1X*	5	5
dNTP	1,6mM	2	4
<i>primer Forward</i>	1mM	0,5	0,8
<i>primer Reverse</i>	1mM	0,5	0,8
MgCl₂	3,0mM	2,5	3
Taq DNA Polimerase	0,1U **	0,25	0,25
DNA molde	10-30ng	1	1
água mili-Q	-	13,25	10,15

*GoTaq[®] Flexi Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl);

** GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega)

Os produtos das amplificações foram visualizados e quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,2 μ g/ml de brometo de etídio e fotodocumentados utilizando o sistema AlphaDigiDoc[®] TM AD 1201 (Figura 15).

Seqüenciamento do DNA

Os produtos de PCR obtidos foram enviados para purificação e seqüenciamento no laboratório da empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>), localizada na Korea, de acordo com as especificações sugeridas pelo laboratório (mínimo de 20 μ l por amos-

tra numa concentração de 100ng/μl). Foram enviados quatro *primers* para o sequenciamento, sendo um *reverse* e três *forward*: P1-LibssuR, P2-LiblsuFa, P3-16sF e P4-LibmtRintF (Tabela 8, acima).

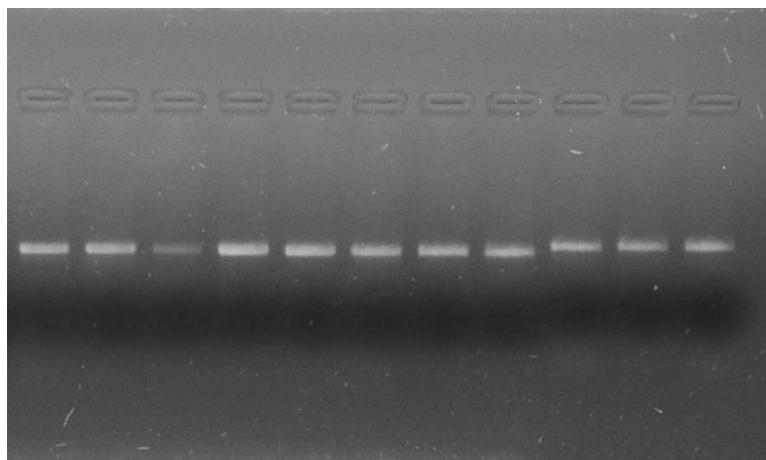


Figura 15: Produtos de amplificação visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% para quantificação das bandas obtidas.

Alinhamento do DNA

Uma vez obtidas as sequências, estas foram avaliadas com o auxílio do programa Consed (Gordon 2004) (Figura 16), que, juntamente com o programa phredPhrap (Ewing & Green 1998, Ewing *et al.* 1998) permite a verificação da qualidade dos dados além de formar os *contigs* para posterior análise. Após esta primeira avaliação, as sequências foram alinhadas com o auxílio do programa Muscle (Edgar 2004).

Análises filogenéticas

A análise Bayesiana foi feita com o auxílio do programa MrBayes (Huelsenbech & Ronquist 2001). O programa MrModelTest (Nylander 2004) foi utilizado para determinar quais parâmetros deveriam ser calculados pelo MrBayes. A análise foi feita com as três partições (rRNA12S, tRNAVal e rRNA16S) em separado e concatenadas. Para produzir cada árvore, foram geradas 1.000.000 de gerações com duas corridas, cada uma contendo 4 cadeias, uma fria e três quentes. Depois de produzidas, as árvores foram comparadas através do teste de Shimodaira-Hasegawa (1999).

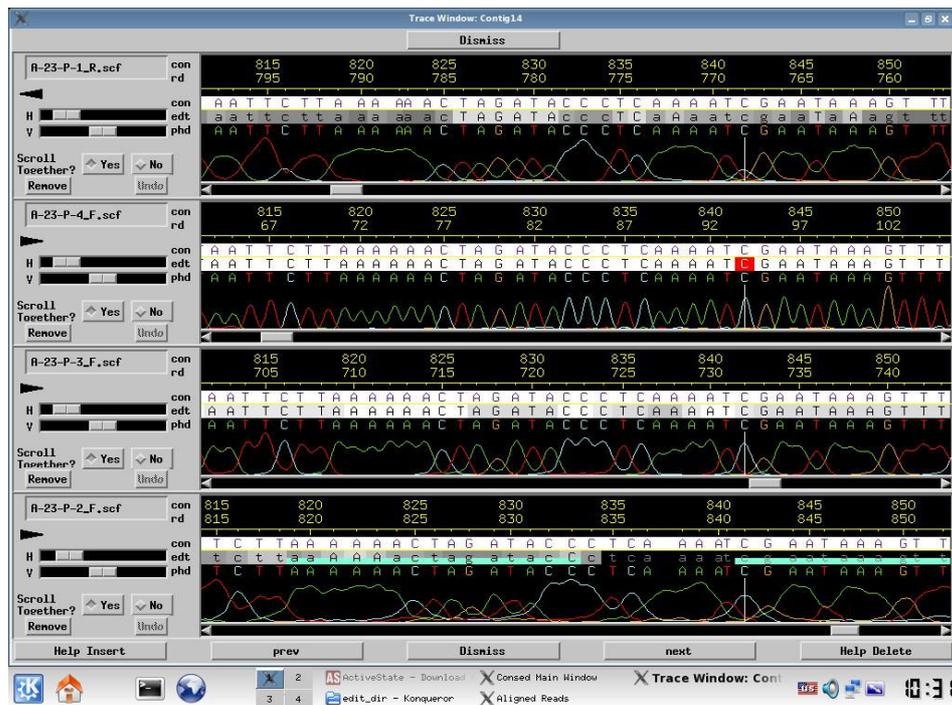


Figura 16: Exemplo de visualização de cromatogramas no programa Consed (Gordon 2004).

Estimativa do tempo de divergência entre as espécies

Para calcular os tempos de divergência entre as espécies dentro da família Libellulidae, foi utilizado o programa BEAST (Drummond & Rambaut 2007), que se baseia em análise bayesiana e estima o tempo de divergência das espécies a partir da calibração de alguns nós da árvore (Drummond & Rambaut 2007). A calibração foi feita através de registros fósseis datados presentes na literatura (Tabela 10). Foram calculadas 50 milhões de gerações, com as configurações padrão (*default*) do programa. O modelo de evolução utilizado foi o *Speciation: Yule Process*, recomendado quando a datação é feita em grupos que contém diferentes espécies. O arquivo gerado pelo BEAST foi analisado pelo pacote TRACER (Rambaut & Drummond 2007), que fornece uma ferramenta gráfica para análises de arquivos gerados por *MCMC*. A datação obtida para cada nó foi utilizada na construção de uma árvore linearizada, que é uma representação esquemática, onde as espécies atuais são alinhadas à direita e a divergência entre elas obedece à datação estimada e tem tamanho proporcional à escala de tempo utilizada.

Tabela 10: Datações de fósseis utilizadas para a calibração das divergências entre os nós. MAA – milhões de anos atrás.

Nó	Idade (MAA)		Referência com a evidência fóssil
	Máxima	Mínima	
Gomphidae	-	190	Misof (2002)
Libellulidae	131,5	94,5	Fleck <i>et al.</i> (1999)
Corduliidae	134	131,5	Jarzembowski & Nel (1996)
<i>Libellula</i>	36	25	Artiss <i>et al.</i> (2001)

Resultados

Análises filogenéticas

O alinhamento das sequências das partições gênicas (rRNA12S, tRNAVal e rRNA16S) resultou em 1907 sítios alinhados, dos quais 1881 são variáveis. Foi feita a exclusão de partes duvidosas, provavelmente regiões *loops*, em que o alinhamento é incerto. A árvore consenso obtida pela inferência bayesiana (Figura 17) utilizando as três partições gênicas (rRNA12S, tRNAVal e rRNA16S) concatenadas não foi diferente das árvores resultantes de cada uma das diferentes partições em separado, portanto apenas uma topologia foi apresentada neste trabalho.

A figura 17 sugere que, considerando Gomphidae como grupo externo, seguindo os resultados de Misof (2002), Corduliidae aparece como grupo irmão de Libellulidae, com alta probabilidade posterior (PP = 1). Após a separação de Corduliidae, todas as espécies de Libellulidae agruparam em um grupo monofilético (PP = 1). Dentro de Libellulidae, a maioria dos grupos recentes (mais à direita da figura) apresentou altos valores de probabilidade posterior (PP), enquanto os ramos mais profundos (mais à esquerda) permaneceram sem resolução, formando uma politomia e com baixos valores de PP.

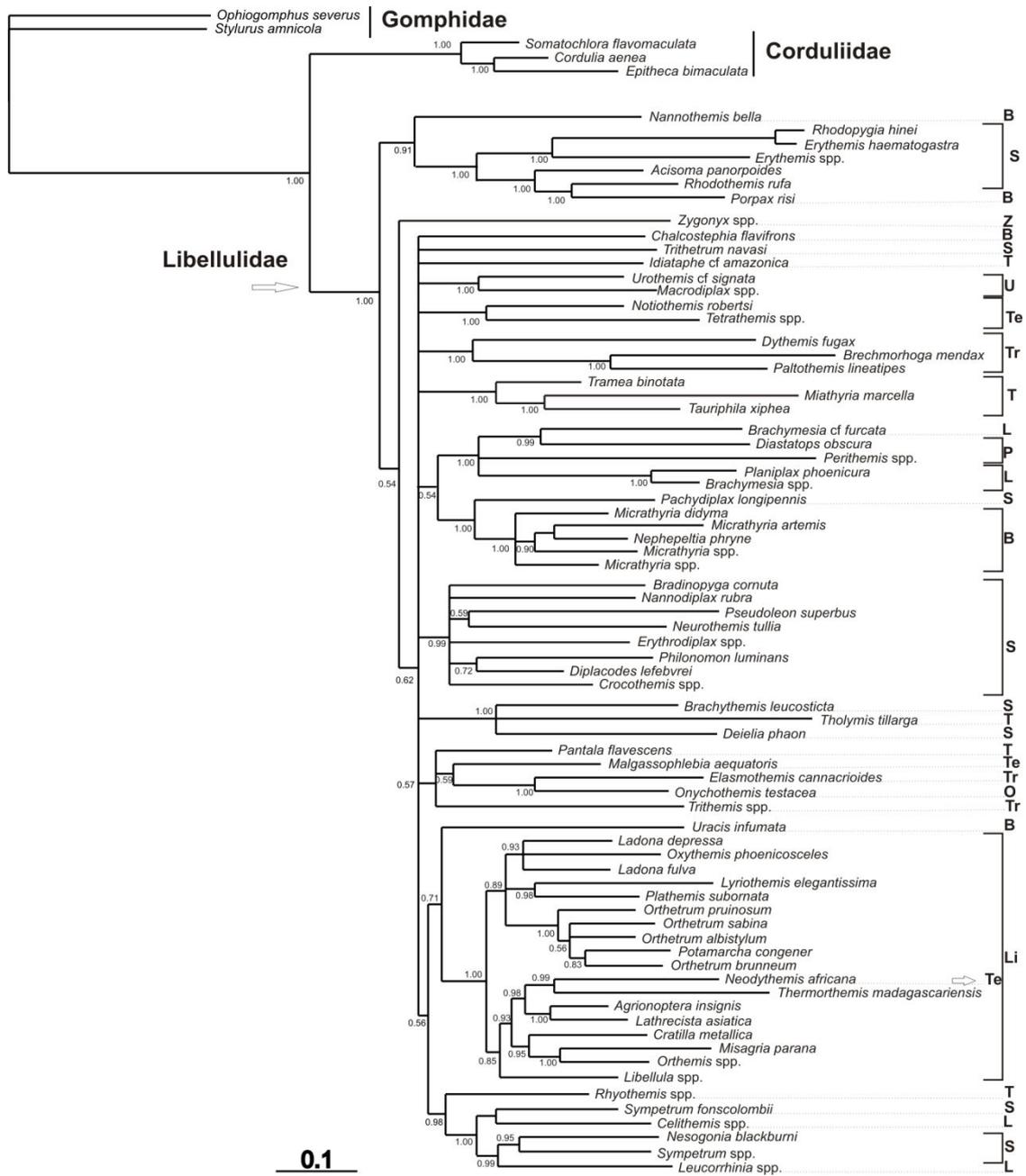


Figura 17: Árvore filogenética obtida por meio de análise bayesiana. Os valores ao lado dos nós internos da árvore correspondem às probabilidades posteriores de cada nó. À direita dos nomes das espécies estão relacionadas as respectivas subfamílias. B – Brachydiplacinae, S – Sympetrinae, Z – Zygonichinae, T – Trameinae, U – Urothemistinae, Te – Tetrathemistinae, Tr – Trithemistinae, L – Leucorrhinae, Li – Libellulinae, P – Palpopleurinae e O – Onychothemistinae. Para simplificar a árvore, sempre que espécies de um mesmo gênero agruparam em um grupo monofilético com $PP \geq 0,95$, estas espécies foram representadas pelo nome do gênero seguido por spp. Os nomes das espécies estão especificados nas tabelas 6 e 7.

Ao contrário do que foi encontrado por Pilgrim & Von Dohlen (2008), a subfamília Libellulinae apareceu como um grupo parafilético, que inclui *Neodythemis africana*, uma espécie pertencente à subfamília Tetrathemistine. Três das espécies de Tetrathemistinae, *Notiothemis robertsi*, *Tetrathemis irregularis* e *Tetrathemis polleni* formaram um grupo monofilético, enquanto *Malgassophlebia aequatoris* agrupou no grupo incluindo Trithemistinae + Onychothemistinae. Para facilitar a visualização da árvore, sempre que todas as espécies do mesmo gênero agruparam em um grupo monofilético, o mesmo foi representado por apenas uma delas. Na figura 17, por exemplo, *Tethrathemis* spp. representa *T. irregularis* e *T. polleni*.

As únicas subfamílias que apareceram como grupos monofiléticos neste trabalho foram Zygonichinae e Urothemistinae, no entanto é necessário enfatizar que foram representadas por apenas 2 e 3 espécies, respectivamente.

Todas as outras subfamílias incluídas no trabalho não apareceram como grupos monofiléticos, com representantes espalhados ao longo de toda a topologia.

Estimativa do tempo de divergência entre as espécies

A árvore linearizada (Figura 18), com tamanhos de ramos proporcionais aos tempos de divergência, apresenta as medianas do tempo estimado para cada nó, cujas datas estimadas estão apresentadas na tabela 11. De acordo com as estimativas feitas a partir dos registros fósseis mostrados na tabela 10, a subordem Eiprocta surgiu há 190 milhões de anos atrás (MAA). A origem da família Corduliidae, provavelmente ocorreu há 127 MAA. A estimativa do tempo para o ancestral comum mais recente (*time to the most recent common ancestor* - TMRCA) entre o ramo das famílias Cordullidae e Libellulidae é de 152 MAA, e a estimativa para a origem de Libellulidae é de 122 MAA.

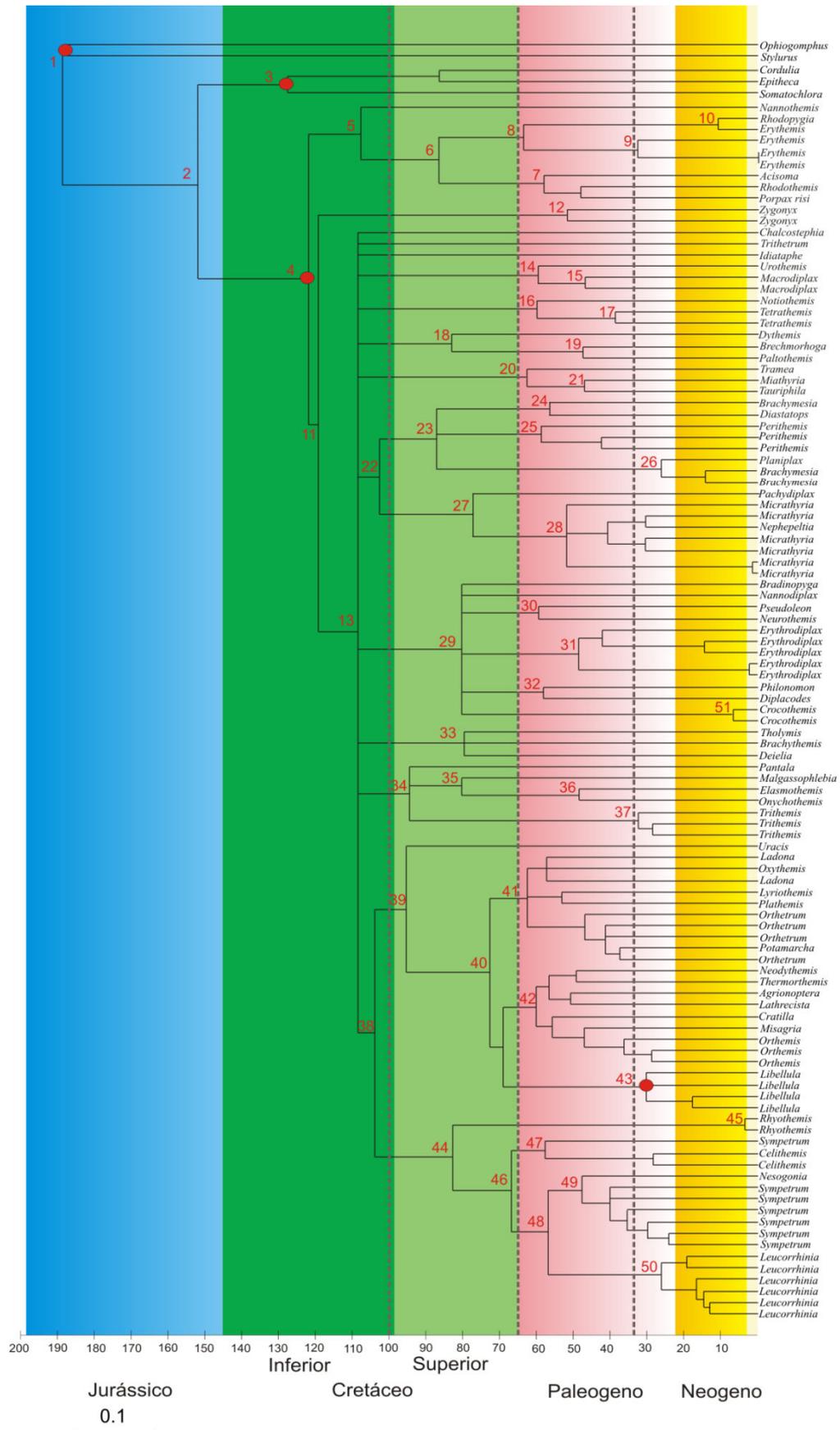


Figura 18: Árvore filogenética linearizada, com tamanhos de ramos proporcionais aos tempos de divergência, em milhões de anos, representados na barra horizontal abaixo da árvore. Os números em vermelho correspondem à identificação dos nós, cujos tempos de divergência encontram-se na tabela 11. Os círculos vermelhos marcam os nós calibrados pelo registro fóssil.

A figura 18 também evidencia três períodos onde houve grande diversificação na família, o primeiro após a grande diversificação das angiospermas, há 100 MAA, o segundo após a grande extinção KT (final do Cretáceo, início do Terciário), há 65 MAA, e o terceiro durante um resfriamento do Planeta, que ocorreu há cerca de 30 MAA.

Tabela 11 Valores de estimativas de divergência entre cada ramo, obtidos pelo programa BEAST. Os nós estão representados na figura 18. MAA – Milhões de anos atrás.

Nó	Data (MAA)	Nó	Data (MAA)	Nó	Data (MAA)
1	189,852	18	82,812	35	82,083
2	152,097	19	48,42	36	49,135
3	127,836	20	62,477	37	32,543
4	122,225	21	46,757	38	104,777
5	107,926	22	103,816	39	96,664
6	86,904	23	87,426	40	73,817
7	58,365	24	57,3	41	63,306
8	63,889	25	59,312	42	61,453
9	32,964	26	26,51	43	30,473
10	11,195	27	77,665	44	83,131
11	120,425	28	52,024	45	3,688
12	51,716	29	80,575	46	67,269
13	120,34	30	59,663	47	57,794
14	60,315	31	48,631	48	57,138
15	47,439	32	58,978	49	48,777
16	60,42	33	79,64	50	26,731
17	38,913	34	94,604	51	6,357

Discussão

Agrupamento de espécies dentro da família Libellulidae

Conforme já apresentado por outros trabalhos (Trueman 1996, Misof *et al.* 2001, Bechley 2002, Saux *et al.* 2003, Resende 2005, Ware *et al.* 2007, Bybee *et al.* 2008, Pilgrim & Von Dohlen 2008), a família Libellulidae apareceu como um grupo monofilético bem sustentado. A divisão em subfamílias, no entanto, não pôde ser recuperada.

As duas únicas subfamílias que apareceram como grupos monofiléticos neste trabalho foram Urothemistinae e Zygonichinae, representadas por apenas 3 e 2 espécies, respectivamente. O trabalho de Pilgrim & Von Dohlen (2008) mostra uma topologia muito próxima à da figura 17, com a exceção da inclusão de representantes da subfamília Tetrathemistinae, da falta de monofiletismo de Urothemistinae (apenas 2 espécies foram incluídas e não agruparam em um mesmo grupo), e do agrupamento das espécies de Libellulinae, que apareceu como um grupo monofilético. Cabe ressaltar que no presente trabalho Libellulinae não apareceu como um grupo monofilético justamente porque incluiu uma espécie de Tetrathemistinae, subfamília não estudada por Pilgrim & Von Dohlen (2008).

As subfamílias propostas por Fraser (1957) não foram originalmente definidas como grupos monofiléticos diagnosticados por sinapomorfias e a maioria das subfamílias foi definida por 2 a 4 caracteres de venação alar. O problema é que cada um destes caracteres pode ser compartilhado por pelo menos mais uma subfamília, e, em alguns casos, todos os membros de uma subfamília não compartilham todas as características da subfamília a que pertencem (Pilgrim & Von Dohlen 2008). É possível que os caracteres alares converjam em diferentes táxons ou mesmo que se trate de polimorfismo ancestral, de modo que sua utilização na subdivisão taxonômica seja comprometida, uma vez que tanto a homoplasia quanto o polimorfismo ancestral são importantes fontes de incongruência em reconstruções filogenéticas (O'Uigin *et al.* 2002).

É possível que a subdivisão tradicional em subfamílias possa ainda ser recuperada com o uso de mais caracteres, tanto morfológicos quanto moleculares. No entanto, diante dos resultados aqui apresentados e do histórico da classificação de Libellulidae, é possível admitir a hipótese de que esta subdivisão seja artificial. Por outro lado, a classificação em gêneros parece mais sustentada, tanto por caracteres moleculares quanto

morfológicos. Para certificar-se do monofiletismo dos gêneros, porém, será necessária a inferência filogenética da família utilizando mais espécies de cada gênero.

Datas de divergência dentro de Libellulidae

O primeiro fóssil conhecido de Libellulidae data entre 94,5 e 131,5 MAA (Fleck *et al.* 1999). Neste trabalho, o surgimento da família foi datado em 122 MAA. Seguindo as datações obtidas, é possível observar pelo menos três períodos de grande diversificação na família. O primeiro se iniciou há aproximadamente 100 MAA e se estendeu até 85 MAA, quando houve um aumento significativo do número de espécies de Libellulidae. Este aumento pode ser explicado pelo fato de que há cerca de 100 MAA houve a grande diversificação das angiospermas, que por sua vez levou à diversificação dos insetos fitófagos, e que também pode ter levado à diversificação de seus predadores, entre eles as libélulas.

O ovipositor de Libellulidae é modificado para oviposição exofítica, ou seja, não depositam seus ovos dentro de tecidos de plantas e sim apenas sobre a planta ou água. Provavelmente ocorreu um processo de redução de caráter em seus ancestrais, em resposta ao limitado nicho de ambiente aquático durante o Triássico e ao aumento de predadores no local de oviposição. Como a oviposição exofítica é mais rápida do que a endofítica, esse tipo pode reduzir a probabilidade de que o indivíduo seja predado enquanto oviposita. Portanto a oviposição exofítica pode ter tido sucesso em resposta à diversificação de predadores dos ancestrais de Libellulidae (Ware *et al.* 2008). E com o surgimento dessa nova estratégia para depositar seus ovos, Libellulidae pôde diversificar em ambientes aquáticos com a diversificação de plantas aquáticas, que podem ter sido utilizadas pelas náíades. Essa associação das náíades com plantas aquáticas já foi encontrada para registros fósseis de espécies de Zygoptera, que foram associadas com *Typha* (Nel & Jarzembowski 1999).

A transição Cretáceo-Terciário (KT) marca o início de outra fase de expansão das espécies de Libellulidae (Figura 18). Trata-se do intervalo de tempo mais bem estudado na história da Terra, uma vez que abrange a última grande extinção em massa, há cerca de 65 MAA (Brown & Lomolino 2006). Postula-se que, após grandes extinções, vários ambientes ficam vagos, sendo posteriormente ocupados por descendentes das espécies sobreviventes. Após o KT a história não deve ter sido diferente, e a figura 18 evidencia um aumento expressivo no número de espécies de Libellulidae após 65 MAA.

Um aumento do número de espécies em um intervalo relativamente curto de tempo é denominado irradiação adaptativa, que ocorre quando um pequeno número de espécies ancestrais de um táxon se diversifica em um número maior de espécies descendentes, ocupando uma variedade mais ampla de nichos ecológicos (Brown & Lomolino 2006). A consequência mais conhecida do KT foi a extinção dos dinossauros, mas este evento teve também grande impacto nas populações e espécies de insetos fitófagos (Wahlberg *et al.* 2009), o que provavelmente teve um forte impacto sobre seus predadores, dentre os quais as libélulas se destacam.

Outro evento importante na diversificação de Libellulidae ocorreu entre o Eoceno e Oligoceno (cerca de 34 MAA), quando ocorreu um resfriamento na Terra e florestas úmidas foram substituídas por gramados (Willis & McElwain 2002). Esse resfriamento foi ocasionado principalmente pela separação da Gondwana em América do Sul, Austrália e Antártica, permitindo correntes oceânicas frias resfriarem o sul da região polar. Com isso, é possível especular que espécies de áreas abertas, dentre elas as pertencentes aos gêneros *Leucorrhinia*, *Sympetrum*, *Libellula* e *Erythemis*, possam ter se diversificado nesse período.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que Libellulidae seja uma família muito antiga, que sobreviveu a pelo menos uma grande extinção em massa e passou por pelo menos três grandes eventos de diversificação. Diante disso, qualquer

tentativa de classificação acima do nível de gêneros pode ser comprometida, uma vez que é possível que os elos entre estes gêneros tenham se perdido num passado remoto. As politomias podem resultar de eventos de radiação adaptativa e de extinções, que prejudicam a detecção das ligações entre as espécies atuais³.

Os caracteres de venação alar, que são os principais caracteres utilizados na classificação dentro de Libellulidae, podem ser muito importantes em termos de qualidade do vôo, com isso pode-se inferir que subfamílias diferentes, caso de fato existam, compartilhem alguns destes caracteres por convergência adaptativa. Por outro lado, estes mesmos caracteres podem ter sido mantidos ao longo do tempo, de modo que diferentes gêneros (pertencentes a diferentes subfamílias) compartilhem estes caracteres pela manutenção de polimorfismo ancestral. É importante lembrar que uma característica pode não se modificar por que não houve pressão seletiva que a modificasse ou, de outra forma, porque houve pressão seletiva para a manutenção.

³ É possível também que estas politomias simplesmente reflitam falta de sinal filogenético das sequências utilizadas. No entanto, todos os trabalhos que tratam de filogenias dentro de Libellulidae apresentam o mesmo padrão, o que pode indicar que todas as sequências utilizadas até então não sejam apropriadas ou que se tratem de politomias reais.

CONCLUSÕES GERAIS

Os dois capítulos apresentados nesta dissertação representam diferentes abordagens que podem ser feitas utilizando como base hipóteses filogenéticas, que vêm sendo obtidas para os mais diversos grupos de organismos, utilizando principalmente caracteres moleculares. Destaca-se nesta dissertação o fato de que a maioria absoluta das sequências utilizadas terem sido obtidas por meio de bancos de dados, o que permitiu a inclusão de espécies que ocorrem em outros continentes, o que seria muito dispendioso de outra maneira.

No primeiro capítulo, foi apresentada a primeira tentativa de uso de métodos comparativos no estudo de caracteres comportamentais em Odonata. Mais especificamente, foi possível relacionar o comportamento de pouso (com asas abertas ou asas fechadas) com o comportamento de forrageio em espécies representativas das diferentes famílias da subordem Zygoptera. Foi ainda possível tentar explicar ambos os comportamentos em termos de agilidade para o escape de eventuais predadores e capacidade de se manter críptico a eles. Estas correlações já tinham sido sugeridas antes por Paulson (2004), que, no entanto, não realizou testes de hipóteses, uma vez que os organismos em estudo são aparentados, e não podem ser tratados como observações independentes.

No segundo capítulo, foi explorada a hipótese de subdivisão de Libellulidae em subfamílias. Trabalhos anteriores, também utilizando sequências de DNA ou proteínas, não recuperaram tal subdivisão, e uma das hipóteses para explicar esta falta de definição seria o fato de que a amostragem de espécies estava incompleta, devido à ausência de espécies da América do Sul. Com isso, foram incluídas sequências de espécies locais, no intuito de melhorar a amostragem de espécies. Apesar do aumento da quantidade de espécies e subfamílias representadas, a filogenia continuou mal resolvida. É possível que ainda se trate de um problema de amostragem de espécies ou mesmo da inadequa-

ção das sequências de DNA até então utilizadas, mas isso deverá ser estudado em trabalhos posteriores. No entanto, uma das hipóteses para que uma filogenia seja mal resolvida são possíveis eventos de extinção em massa seguidos de eventos de radiação adaptativa. Para testar esta hipótese, seria necessária uma datação dos eventos de especiação, o que foi possível graças a métodos que permitem a datação através da integração de filogenias moleculares com registros fósseis datados. Como resultado, foi possível constatar que a família Libellulidae é bastante antiga, e que os períodos nos quais houve grandes eventos de radiação na família de fato coincidem com a diversificação de angiospermas (100 MAA), com a extinção KT (65 MAA) e com o resfriamento da Terra entre o Eoceno e o Oligoceno (34 MAA).

Apesar de ser um grupo com amplas possibilidades para estudos evolutivos, por conter alta variabilidade tanto morfológica quanto de estratégias comportamentais, estudos em Odonata que visem testes de hipóteses para esclarecer questões evolutivas são bastante escassos. De fato, pelo menos do que pode ser levantado para este trabalho, não há estudos envolvendo métodos comparativos para testes de hipóteses de comportamentos em libélulas e o único trabalho envolvendo alguma tentativa de datação da diversificação dentro da ordem (Ware *et al.* 2008) se baseou em uma subamostragem dos registros fósseis disponíveis, comprometendo as conclusões.

Este é o primeiro resultado de uma série de estudos envolvendo membros da ordem Odonata, que se destinam a compreender, por meio de testes de hipóteses, a evolução de diferentes comportamentos e caracteres morfológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcock, J., 1982. Post-copulatory guarding by males of the damselfly *Hetaerina vulnerata* Selys (Odonata: Calopterygidae). *Animal Behaviour*. 30: 99-107.
- Artiss, T. 2001. Structure and function of male genitalia in *Libellula*, *Ladona* and *Plathemis* (Anisoptera: Libellulidae). *Odonatologica*. 30: 13-27.
- Artiss, T.; Schultz, T. R.; Polhemus, D. A. & Simon, C. 2001. Molecular Phylogenetic Analysis of the Dragonfly Genera *Libellula*, *Ladona*, and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and 16S rRNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18: 348-361.
- Bechly, G., 1996. Morphologische untersuchungen am Flügelgeader der rezenten Libellen und deren Stammgruppenvertreter (Insecta; Pterygota; Odonata) unter besonderer Berücksichtigung der phylogentischen Systematik und des Grundplanes der Odonata. *Petalura*. 2: 1-402
- Bechly, G. 2002. The phylogenetic systematics of Odonata. Disponível em <http://www.bechly.de/phylosys.htm>
- Blomberg, S. P. & Garland, J. T. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation, and comparative methods. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 1-12.
- Bridges, C. A. 1994. Catalogue of the Family-Group, Genus-Group and Species-Group Names of the Odonata of the World, 3rd edn. C.A. Bridges, Champaign, IL.
- Bromham, L. D.; Phillips, M. J. & Penny, D. 1999. Growing up with dinosaurs: molecular dates and the mammalian radiation. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 113-118.
- Bromham, L. & Penny, D. 2003. The Modern Molecular Clock. *Nature*. 4: 216-224.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. 2006. Biogeografia. Ed. FUNPEC. 692p.
- Burt, B. B. 2001. Evolutionary stasis, constraint and other terminology describing evolutionary patterns. *Biological Journal of Linnean Society*. 72: 509-517.
- Bybee, S. M.; Ogden, T. H.; Branham, M. A. & Whiting, M. F. 2008. Molecules, morphology and fossils: a comprehensive approach to odonate phylogeny and the evolution of the odonate wing. *Cladistics*. 23: 1-38.
- Carle, F. L.; Kjer, K. M.; May, M. L. 2008. Evolution of Odonata, with special reference to Coenagrionoidea (Zygoptera). *Arthropod Systematics & Phylogeny*. 66: 37-44.
- Carle, F. L., 1982. The wing vein homologies and phylogeny of the Odonata: a continuing debate. *Societas Intis Odonatologica Rapid Comm*. 4: 1-57.
- Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. 19: 122-257.
- Comstock, J. H. & Needham, J. G. 1898. The venation of the wings of the Odonata. *American Naturalist*. 32: 903-911.
- Corbet, P. S. 1999. Dragonflies: behavior and ecology of Odonata. Comstock, Ithaca/NY. 829 p.
- Cordero, A.; Santolamazza-Carbone, S. & Utzeri, C. 1995. Male disturbance, repeated insemination and sperm competition in the damselfly *Coenagrion scitulum* (Zygoptera: Coenagrionidae). *Animal Behaviour*. 49: 437-449.
- Córdoba-Aguilar, A. 2005. Possible coevolution of male and female genital form and function in a calopterygid damselfly. *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 132-137.

- Costa, J. M.; Lourenço, A. do N. & Vieira, L. P. 2002. Chave de identificação para imagos dos gêneros de Libellulidae citados para o Brasil – comentários sobre os gêneros (Odonata: Anisoptera). *Entomologia y Vectores*. 9: 477-504.
- De Marco, P. Jr & Resende, D. C. 2002. Activity patterns and thermoregulation in a tropical dragonfly assemblage. *Odonatologica*. 31: 129-138.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 214.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32: 1792-97.
- Efron, B.; Halloran, E. & Holmes, S. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Ewing, B. & Green. P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8: 186-194.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. & Green, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*. 8: 175-185.
- Fabricius, J. C. 1775. *Systema Entomologiae, sistens insectorum classes, ordines genera, species, adiectus synonymus, locis, descriptionibus, observationibus*. Korte, Flensburgi et Lipsiae (Flensburg and Leipzig), 32+832 pp.
- Fabricius, J. C. 1793. *Entomologicae Systematica, emendata et aucta, vol 2*. Hafniae (Heidelberg), 519 pp.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximumlikelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368–376.
- Fincke, O. 1997. Conflict resolution in the Odonata: implications for understanding female mating patterns and female choice. *Biological Journal of the Linnean Society*. 60: 201-220.
- Fleck, G.; Ullrich, B.; Brenk, M.; Wallnisch, C.; Orland, M.; Bleidissel, S. & Misof, B. 2008a. A phylogeny of anisopterous dragonflies (Insecta, Odonata) using mtRNA genes and mixed nucleotide / doublet models. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46: 310–322.
- Fleck, G.; Brenk, M. & Misof, B. 2008b. Larval and molecular characters help to solve phylogenetic puzzles in the highly diverse dragonfly family Libellulidae (Insecta: Odonata: Anisoptera): The Tetrathemistinae are a polyphyletic group. *Organisms, Diversity & Evolution*. 8: 1–16.
- Fleck, G.; Nel, A.; Bechly, G.; Delclos, X.; Jarzembowski, E. A. & Coram, R. A. 2008c. New Lower Cretaceous “libelluloid” dragonflies (Insecta: Odonata: Cavilabiata) with notes about estimated divergence dates for this group. *Palaeodiversity*. 1: 19-36.
- Fleck, G.; Nel, A. & Martinez-Delclos. 1999. The oldest record of libellulid dragonflies from the Upper Cretaceous of Kazakhstan (Insecta:Odonata, Anisoptera). *Cretaceous Research*. 20: 655–658.
- Fraser, F. C. 1957. *A reclassification of the order Odonata*. Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney, Australia. 134.
- Gordon, D. 2004. Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed, in *Current Protocols in Bioinformatics*, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co, 11.2.1-11.2.43.
- Hartung, M., 2002. *Heteragrion palmichale* spec. nov., a new damselfly from Cordillera de la Costa, Venezuela (Zygoptera: Megapodagrionidae). *Odonatologica*. 31:187-191.

- Harvey, P. H. & Pagel, M. D. 1991. The comparative Method in Evolutionary Biology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hasegawa, E. & Kasuya, E. 2006. Phylogenetic analysis of the insect order Odonata using 28S and 16S rDNA sequences: a comparison between data sets with different evolutionary rates. *Entomological Science*. 9: 55–66.
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana, 263 pp.
- Heymer, A., 1975. Der stammesgeschichtliche Aussagewert des Verhaltens der Libelle *Epallage fatime* Charp. 1840. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 37: 163-181.
- Huelsenbech, J. P. & Ronquist, F. 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics Applications Notes*. 17: 754–755.
- Jacobs, M. E. 1955. Studies on territorialism and sexual selection in dragonflies. *Ecology*. 36: 566-586.
- Jarzembowski, E. A. & Nel, A. 1996. New fossil dragonflies from the Lower Cretaceous of SE England and the phylogeny of the superfamily Libelluloidea (Insecta: Odonata). *Cretaceous Research*. 17: 67–85.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21–132 in H. N. MUNRO, ed. *Mammalian protein metabolism III*. Academic Press, New York.
- Kalkman, V. J.; Clausnitzer, V.; Dijkstra, K.; Orr, A. G.; Paulson, D. R. & Tol, J. V. 2008. Global diversity of dragonflies (Odonata) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: 351-363.
- Kambhampati, S. & Charlton, R. E. 1999. Phylogenetic relationship among *Libellula*, *Ladona*, and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on DNA sequence of mitochondrial 16S rRNA gene. *Systematic Entomology*. 24: 37–49.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217: 624–626.
- Krebs, J. R. & Davies, N. B. 1996. *Introdução à Ecologia Comportamental*. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora. 420 p.
- Leach, W. E. 1815. Entomology. In: *Edinburgh Encyclopedia* Brewster, Edinburgh, pp 57–172.
- Lencioni, F. A. A. 2005. *Damselflies of Brazil: an illustrated identification guide 1 – Non-Coenagrionidae families*. All Print Editora, São Paulo, 323 p.
- Lencioni, F. A. A. 2006. *Damselflies of Brazil: an illustrated identification guide 2 – Coenagrionidae*. All Print Editora, São Paulo, 419 p.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata. Tomus I. Laurentii Salvii, Holmiae, 828 pp.
- Loiola, G. R. 2005. *Comportamento reprodutivo de Heteragrion consors* (Odonata: Zygoptera: Megapodagrionidae) na Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, ES. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Espírito Santo.
- Machado, A. B. M.; Fonseca, G. A. B.; Machado, R. B.; Aguiar, L. M. S. & Lins, L. V. 1998. *Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais*, Biodiversitas, Belo Horizonte.

- Maddison, W. P. 1990. A method for testing the correlated evolutionary of two binary characters: are gains and losses concentrated on certain branches of a phylogenetic tree. *Evolution*. 44: 539–557.
- Martynov A.V. 1923. On two basic types of insect wings and their significance for the general classification of insects. *Trudy 1st All Russia Congress of Zoology, Anatomy & Histology, Petrograd, 1922*, pp. 38–89.
- Miller, P. L. 1995. Sperm competition and penis structure in some Libellulid Dragonflies (Anisoptera). *Odonatologica*. 24: 63-72.
- Misof, B. 2002. Diversity of Anisoptera (Odonata): Inferring speciation processes from patterns of morphological diversity. *Zoology*. 105: 355-365.
- Misof, B.; Anderson, C. L. & Hadrys, H. 2000. A Phylogeny of the Damselfly Genus *Calopteryx* (Odonata) Using Mitochondrial 16S rDNA Markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15: 5–14.
- Misof, B.; Rickert, A. M.; Buckley, T. R.; Fleck, G. & Sauer, K. P. 2001. Phylogenetic signal and its decay in mitochondrial SSU and LSU rRNA gene fragments of Anisoptera. *Molecular Biology and Evolution*. 18: 27-37.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333p.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModelTest. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- O’Higin, C.; Satta, Y.; Takahata, N. & Klein, J. 2002. Contribution of Homoplasy and of Ancestral Polymorphism to the Evolution of Genes in Anthropoid Primates. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1501–1513.
- Pagel, M. 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings the Royal Society London B*. 255: 37–45.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*. 401: 877–84.
- Pagel, M. & Meade, A. 2006a. Manual BayesTraits. Disponível em www.evolution.rdg.ac.uk.
- Pagel, M. & Meade, A. 2006b. Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *American Naturalist*, 167: 808-825.
- Pagel, M. 2004. Comparative Method, in *Evolutionary Studies*. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. 2403-2410.
- Paulson, D. R. 2004. Why do some zygopterans (Odonata) perch with open wings? *International Journal of Odonatology*. 7: 505-515.
- Paulson, D. R. 2006. Openwing perching in some Zygoptera (Odonata): a response to Klaus Reinhardt. *International Journal of Odonatology*. 9: 111-118.
- Paulson, D. R. 2007. List of the Odonata of South America, by country. Disponível em <http://www.ups.edu/x7039.xml>
- Paulson, D. R. 1981. Anatomical modifications for displaying bright coloration in megapodagrionid and chlorocyphid dragonflies (Zygoptera). *Odonatologica*. 10: 301-310.
- Pfau, H. K. 1991. Contributions of functional morphology to the phylogenetic systematics of Odonata. *Adv Odonatol*. 5:109–141.

- Pilgrim, E. M. & Von Dohlen, C. D. 2008. Phylogeny of the Sympetrinae (Odonata : Libellulidae): further evidence of the homoplasious nature of wing venation. *Systematic Entomology*. 33: 159-174.
- Raftery, A. E. 1996. Hypothesis testing and model selection. Pages 163–188 in W. R. Gilks, S. Richardson, and D. J. Spiegelhalter, eds. *Markov Chain Monte Carlo in practice*. Chapman & Hall, London.
- Rambur, M. P. 1842. *Histoire Naturelle des Insectes Nevropteres*. Librairie Encyclopedique de Roret, Paris, 529 pp.
- Rehn, A. C. 2003. Phylogenetic analysis of higher-level relationships of Odonata. *Systematic Entomology*. 28: 181–241.
- Reinhardt, K. 2006. Open questions in the evolution of openwing perching in the Zygoptera (Odonata): a comment on Paulson. *International Journal of Odonatology*. 9: 103-109.
- Resende, D. C. 2005. Filogenia de Libellulidae (Anisoptera: Odonata) e efeitos do tamanho corporal e da termorregulação sobre a evolução do comportamento. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa.
- Ridley, M. 1983. *The Explanation of Organic Diversity: the Comparative Method and Adaptations for Mating*. Oxford University Press, Oxford.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 945–967.
- Samways, M. J. 2006. Open and banded wings: Hypotheses on Damselfly Wing Position (Zygoptera). *Odonatologica*. 35: 67-73.
- Saux, C.; Simon, C. & Spicer, G. S. 2003. Phylogeny of the dragonfly and damselfly order Odonata as inferred by mitochondrial 12S Ribosomal RNA sequences. *Annals of the Entomological Society of America*. 96: 693-699.
- Sawada, K. 1998. Sperm precedence in the damselfly *Ischnura senegalensis* (Rambur): is prolonged copulation advantageous to sperm precedence? (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*. 27: 425-431.
- Schorr, M.; Lindeboom, M. & Paulson, D. 2007. Word Odonata List. <http://www.ups.edu/media/SlaterMuseum/WorldOdonataList.pdf>
- Shimodaira, H. & Hasegawa, H. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 1114-1116.
- Simpson, G.G. 1944. *Tempo and Mode in Evolution*. Columbia University Press, New York.
- Siva-Jothy, M. T. & Hooper, R. E. 1996. Differential use of stored sperm during oviposition in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39: 389-393.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Tillyard, R. J. & Fraser, F. C. 1938. A reclassification of the order Odonata, based on some new interpretations of the venation of the dragonfly wing. *Australian Zoologist*. 9: 125–169, 195–221, 359–396.
- Tillyard, R. J. 1917. *The biology of dragonflies*. Cambridge University Press, London, 396 pp.

- Trueman, J. W. H. 2007. A brief history of the classification and nomenclature of Odonata. In: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A. (Eds) Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa. 1668: 1–766.
- Trueman, J. W. H. 1996. A preliminary cladistic analysis of odonate wing venation. *Odonatologica*. 25: 59–72.
- Waage, J. K. 1979. Dual function of the damselfly penis: Sperm removal and sperm transfer. *Science*. 203: 916–917.
- Wahlberg, N.; Leneveu, J.; Kodandaramaiah, U.; Peña, C.; Nylin, S.; Freitas, A. V. L. & Brower, A. V. Z. 2009. Nymphalid butterflies diversify following near demise at the Cretaceous/Tertiary boundary. *Proceedings the Royal Society B*. 276: 4295–4302.
- Waldschmidt, A. M., Salomão, T. M. F., Barros, E. G & Campos, L. A. O. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*. 20: 421–423.
- Ware, J., May, M. & Kjer, K. 2007. Phylogeny of the higher Libelluloidea (Anisoptera: Odonata): an exploration of the most speciose superfamily of dragonflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45: 289–310.
- Ware, J. L., Simon, Y. W. & Kjer, K. 2008. Divergence dates of libelluloid dragonflies (Odonata: Anisoptera) estimated from rRNA using paired-site substitution models. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 47: 426–432.
- Willis, K. J. & McElwain, J. C. 2002 *The evolution of plants*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Wilson, E. O. 1975. *Sociobiology. The New Synthesis*. Harvard University Press, Cambridge.
- Yamauchi, M. M.; Miya, M. U.; Machida, R. J. & Nishida, M. 2004. PCR-based approach for sequencing mitochondrial genomes of decapod crustaceans, with a practical example from kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Mar Biotechnol*. 6:419–429.
- Yang, Z. & Ranalla, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markovchain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 717–724.
- Zuckermandl, E. & Pauling, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97–166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. BRVSON and H. VoGET. Academic Press, New York.