

CAMILA DE SOUSA QUEIROZ

ESTRUTURA POPULACIONAL EM *Erythrodiplax fusca* RAMBUR 1842 E *Orthemis discolor* BURMEISTER 1839 (ODONATA: LIBELLULIDAE): MORFOMETRIA E MARCADORES MOLECULARES NAS QUESTÕES MICROEVOLUTIVAS

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2014

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Q3e  
2014

Queiroz, Camila de Sousa, 1986-

Estrutura populacional em *Erythrodiplax fusca* Rambur 1842 e *Orthemis discolor* Burmeister 1839 (Odonata: Libellulidae): morfometria e marcadores moleculares nas questões microevolutivas / Camila de Sousa Queiroz. – Viçosa, MG, 2014.

xiv, 87 f.: il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2014.

Referências bibliográficas: f. 72-78.

1. Libélula. 2. Genética de populações. 3. Procrustes, Método de. I. Campos, Lucio Antônio de Oliveira, 1947-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 595.733

CAMILA DE SOUSA QUEIROZ

ESTRUTURA POPULACIONAL EM *Erythrodiplax fusca* RAMBUR 1842 E *Orthemis discolor* BURMEISTER 1839 (ODONATA: LIBELLULIDAE): MORFOMETRIA E MARCADORES MOLECULARES NAS QUESTÕES MICROEVOLUTIVAS

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014

---

Karla Suemy Clemente Yotoko  
(Coorientadora)

---

Vera Nisaka Solferini

---

Jorge Abdala Dergam dos Santos

---

Pedro Seyferth Ribeiro Romano

---

Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Orientador)

*Aos meus pais Vera e Arcanjo,  
com amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente e mais uma vez aos meus pais, Vera e Arcanjo, e aos meus irmãos, Lucas e Laura, pelo amor incondicional e pelo apoio no fim de uma grande etapa da minha vida;

Ao meu amor, Rafael, por ser meu melhor companheiro e amigo, por me fazer sorrir em qualquer situação e por tornar cada dia mais especial;

Aos amigos de longa data, especialmente Fausto, Juliana Clemente, Juliana Blaser e Mariana, pelas conversas leves e divertidas, pelos eventos bombantes em Juiz de fora e pelos conselhos nas horas difíceis;

Aos meus orientadores e amigos, Karla e Lucio, que acreditaram e investiram no meu potencial, além de manterem o estoque de chocolate necessário para acalmar meus nervos;

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática e Evolução (UFV), Amanda, Fábio, Jansen, João, Mariana, Natália Maria, Tércia, Thiago e Verônica, pelas conversas, risadas e o cafezinho nosso de cada dia; agradecimento especial à inonha Verônica que aturou todos os meus devaneios e crises existenciais com paciência e carinho e à inonha Amanda que me acompanhou nos melhores eventos sociais de Viçosa;

Aos colegas do Laboratório de Diversidade Genética e Evolução (UFSCAR – Sorocaba), Prof. Evandro, Heidi, Izabel e Manolo, pelo apoio na parte inicial do desenvolvimento dos marcadores moleculares;

Às amigas Bruna, Carolina, Marina e Valéria pelo acolhimento, pela minha primeira vivência em república e, claro, pelas conversas ao redor do prato de brigadeiro;

Aos colegas do Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle (UFV), Marina, Natália Travenzoli, Natália Sanches, Vinícius e Prof. Jorge que mantiveram as portas sempre abertas para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Ecologia (UFV), Prof. Carlos, Prof.<sup>a</sup> Flávia, Prof. Ricardo e os técnicos Sílvia e Chiquinho pela disponibilização da estrutura do laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Fitopatógenos (UFV), Prof. Eduardo Mizubuti, Robson e Brás, pelo apoio nas clonagens;

À Amanda, Prof. Anderson, Prof.<sup>a</sup> Daniela, Fábio, Jansen, Thiago, Verônica e Waldor, pelo auxílio nas coletas;

À Amanda, pela digitalização das asas e marcação dos pontos;

Ao Helder, pelo preparo do mapa com os pontos de coleta e pelo acerto no protocolo de extração de DNA;

Aos demais professores, funcionários e colegas de curso pelo convívio;

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento pela estrutura oferecida;

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e à FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos que participaram mesmo que indiretamente para mais este sonho realizado.

Todos vocês fazem parte desta conquista e têm um papel especial na minha vida. Obrigada!

## BIOGRAFIA

Camila de Sousa Queiroz, filha de Arcanjo Castilho de Queiroz e Veralúcia Bibiana de Sousa Queiroz, nasceu no dia 16 de janeiro de 1986 em Juiz de Fora - MG. Concluiu o ensino fundamental em 2000 no Colégio Militar de Juiz de Fora e o ensino médio na mesma instituição em 2003. Desde o início do ensino médio já sabia com o que iria trabalhar: Genética! Para isso, graduou-se no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora na modalidade licenciatura em julho de 2007 e na modalidade bacharelado em dezembro do mesmo ano. Durante a graduação, atuou em projetos de citogenética de verbenáceas da Cadeia do Espinhaço – MG e filogenia do gênero *Lippia* (Verbenaceae), este último, tema de sua monografia. Em março de 2008 ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2010, sobre evolução em concerto incompleta e pseudogenes de ITS em *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). Iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa em março de 2010. No começo, atuou como bolsista CAPES-REUNI e participou da disciplina de graduação BIO240 – Genética como monitora e mediadora do fórum de discussões online no PVANet. Agora trabalhando com libélulas, se dedicou ao estudo de tópicos relacionados à Genética de Populações e à Evolução, sempre buscando a integração com as perspectivas de conservação e preservação. Enfim, após 10 anos exaustivos de muita dedicação e suor, acho que posso finalmente dizer: sou geneticista!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 – MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS DE <i>ORTHEMIS</i> <i>DISCOLOR</i> E <i>ERYTHRODIPLAX FUSCA</i> .....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos .....	10
<i>Amostras e coleta</i> .....	10
<i>Digitalização das asas</i> .....	14
<i>Análise da variação no tamanho do centroide das asas</i> .....	17
<i>Análise da variação na forma das asas</i> .....	18
Resultados.....	19
<i>Variação no tamanho do centroide entre as localidades</i> .....	19
<i>Variação na forma da asa entre as localidades</i> .....	21
Discussão .....	30
CAPÍTULO 2 – CÓPIAS NUCLEARES DE GENES MITOCONDRIAIS ( <i>NUMTS</i> ) EM ODONATA.....	35
Abstract .....	37
Introduction.....	38
Materials and Methods.....	39
Results .....	41
Discussion .....	44
Acknowledgments.....	46

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE <i>ERYTHRODIPLAX FUSCA</i> E <i>ORTHEMIS DISCOLOR</i> COM MARCADORES DE DNA NUCLEAR .....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos .....	49
<i>Extração do DNA</i> .....	49
<i>Escolha dos genes para análise</i> .....	51
<i>Amplificação e sequenciamento</i> .....	53
<i>Análise da variação genética</i> .....	54
Resultados e Discussão .....	57
<i>Esforço de sequenciamento e amostragem</i> .....	57
<i>Variação genética</i> .....	59
CONCLUSÕES GERAIS .....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
APÊNDICE.....	79
Apêndice A - Protocolos .....	80
<i>Coleta e preparo das libélulas para armazenamento</i> .....	80
<i>Extração de DNA de Odonata – Protocolo Padrão LBE</i> .....	80
<i>Extração de DNA de Odonata – Protocolo Modificado LBE</i> .....	81
<i>Extração de DNA de Odonata – Protocolo Fernandes Salomão et al. (2005) modificado</i> .....	83
<i>Quantificação em gel de agarose 0,8%</i> .....	84
<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	85
<i>Envio das amostras para sequenciamento na Macrogen Inc - Korea</i> .....	87

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies estudadas, A - *Erythrodiplax fusca* e B – *Orthemis discolor*. ..... 4
- Figura 2.** Asas anterior e posterior direita de um Libellulidae. A alça anal está destacada com contorno em azul e indicada pela seta. Foto modificada a partir de W. Y. Chen (<http://www.imdap.entomol.ntu.edu.tw>). ..... 4
- Figura 1. 1.** Distância em quilômetros (km) entre as localidades de coleta. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude. ....12
- Figura 1. 2.** Distribuição das localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* (Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira, Muriaé, Rio Pomba e Viçosa) no mapa altimétrico regional. A seta indica a Serra do Brigadeiro.....13
- Figura 1. 3.** Representação dos 10 marcos anatômicos escolhidos para as asas anterior e posterior de *Erythrodiplax fusca*. .....16
- Figura 1. 4.** Representação dos 10 marcos anatômicos escolhidos para as asas anterior e posterior de *Orthemis discolor*. .....16
- Figura 1. 5.** Variação entre as localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* no tamanho do centroide das asas anteriores e posteriores. Letras iguais em baixo de cada “box” indicam as localidades que puderam ser amalgamadas na comparação de modelos pela análise de contrastes e, portanto, não apresentam médias significativamente diferentes. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa.20
- Figura 1. 6.** Variação entre as localidades de coleta de *Orthemis discolor* no tamanho do centroide das asas anteriores e posteriores. Letras iguais em baixo de cada “box” indicam as localidades que puderam ser amalgamadas na comparação de modelos pela análise de contrastes e, portanto, não apresentam médias significativamente diferentes. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa.....21
- Figura 1. 7.** Representação esquemática dos dois grupos de forma dados pela MANOVA das deformações relativas em *Erythrodiplax fusca* para ambas as asas. As localidades pertencentes ao mesmo grupo de forma estão ligadas por linhas tracejadas de mesma cor. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude. ....22

**Figura 1. 8.** Análise gráfica da primeira e segunda variáveis canônicas em *Erythrodiplax fusca* para a asa anterior e posterior, com a porcentagem de explicação de cada variável entre parênteses. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Os grupos de forma identificados pela MANOVA das deformações relativas e distância de Procrustes estão representados por pontos do mesmo tipo: grupo 1 (Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira) – quadrados em tons de azul; grupo 2 (Muriaé, Rio Pomba e Viçosa) – círculos em tons de vermelho. ....23

**Figura 1. 9.** Histograma dos escores de validação cruzada obtidos na análise discriminante em *Erythrodiplax fusca*. O grupo 1 é formado pelas localidades de Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira e o grupo 2 por Muriaé, Rio Pomba e Viçosa, conforme indicado pela MANOVA das deformações relativas e distâncias de Procrustes. ....25

**Figura 1. 10.** Diferenças de forma das asas em *Erythrodiplax fusca* entre os grupos significativos na MANOVA das deformações relativas. A forma média do grupo 1 (Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira) está representada pela linha azul cheia que liga os marcos anatômicos de 1 a 10 e a forma média do grupo 2 (Muriaé, Rio Pomba e Viçosa), pela linha vermelha tracejada. As diferenças entre os dois grupos foram ampliadas em 10 vezes para facilitar a visualização. ....26

**Figura 1. 11.** Representação esquemática dos dois grupos de forma dados pela MANOVA em *Orthemis discolor* para ambas as asas. As localidades pertencentes ao mesmo grupo de forma estão ligadas por linhas tracejadas de mesma cor. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude. ....26

**Figura 1. 12.** Análise gráfica da primeira e segunda variáveis canônicas em *Orthemis discolor* para a asa anterior e asa posterior, com a porcentagem de explicação de cada variável entre parênteses. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Os grupos de forma identificados pela MANOVA das deformações relativas e distância de Procrustes estão representados por pontos do mesmo tipo: grupo 1 (Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba) – quadrados em tons de vermelho; grupo 2 (Viçosa) – círculo azul. ....28

**Figura 1. 13.** Histograma dos escores de validação cruzada obtidos na análise discriminante em *Orthemis discolor*. O grupo 1 é formado pela localidade de Viçosa e o grupo 2 por Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba, conforme indicado pela MANOVA das deformações relativas e distâncias de Procrustes. ....29

**Figura 1. 14.** Diferenças de forma das asas em *Orthemis discolor* entre os grupos significativos na MANOVA das deformações relativas. A forma média do grupo 1 (Viçosa) está representada pela linha azul cheia que liga os marcos anatômicos de 1 a 10 e a forma média do grupo 2 (Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba),

pela linha vermelha tracejada. As diferenças entre os dois grupos foram ampliadas em 10 vezes para facilitar a visualização. ....30

**Figure 2. 1.** Partial chromatograms showing the same region of three sequences produced from PCR fragments obtained using primers designed to amplify the NADH dehydrogenase subunit 1 mitochondrial gene in *Erythrodyplax fusca*. (A) Example of a chromatogram showing a putative mtDNA sequence. Chromatograms showing the forward (B) and reverse (C) sequences of the same individual, with double peaks (Highlighted with dashed lines). The letter above each peak indicates the corresponding nucleotide (A - adenine, C - cytosine, G - guanine, T - thymine and R - purine). ....42

**Figure 2. 2.** Partial chromatograms showing the same region of three sequences produced from PCR fragments obtained using primers designed to amplify the NADH dehydrogenase subunit 1 mitochondrial gene in *Erythrodyplax fusca*. (A) Example of a chromatogram showing a putative mtDNA sequence. (B and C) Chromatograms showing two different individuals with T insertions at the same position (indicated by an arrow), producing an anomalous amino acid sequence. The letter above each peak indicates the corresponding nucleotide (A - adenine, C - cytosine, G - guanine, T - thymine). ....43

**Figura 3. 1.** Variação intraindividual na região EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca*. A – cromatograma com uma sequência única; B – cromatograma exemplificando a sobreposição de no mínimo duas sequências distintas, fato evidenciado pela presença de picos duplos. As linhas tracejadas destacam os sítios em que os picos duplos foram observados em B. ....55

**Figura 3. 2.** Variação intraindividual na região Anon em *Orthemis discolor*. A – cromatograma com uma sequência única; B – cromatograma exemplificando a sobreposição de duas sequências do mesmo gene com tamanhos diferentes devido à ocorrência de uma inserção/deleção. A linha tracejada indica o sítio em que inicia a sobreposição das duas sequências. A partir deste ponto, é possível notar ainda que um dos picos do cromatograma em B corresponde à cópia presente em A. ....56

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. 1.** Localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* no estado de Minas Gerais.  $N_{AA}$  – tamanho da amostra utilizada para as análises morfométricas da asa anterior;  $N_{AP}$  – tamanho da amostra para as análises morfométricas da asa posterior.....11
- Tabela 1. 2.** Descrição dos marcos anatômicos escolhidos para *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*. A nomenclatura das nervuras segue a proposta de Needham (1903) modificada por Borror (1945), conforme a ilustração em Heckman (2006). .15
- Tabela 1. 3.** Distância de Procrustes entre as localidades de coleta em *Erythrodiplax fusca*. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias para a asa anterior e os valores acima, para a posterior. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Distâncias significativas ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*”.22
- Tabela 1. 4.** Distância de Procrustes entre as localidades de coleta em *Orthemis discolor*. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias para a asa anterior e os valores acima, para a posterior. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Distâncias significativas ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*” .....27
- Tabela 3. 1.** Sequência dos pares de “primers” usados para cada região nuclear..54
- Tabela 3. 2.** Comparação entre o número de indivíduos capturados (NC), sequências solicitadas (somadas as tentativas com os “primers” direto e reverso, NS) e o número de sequências efetivamente aproveitado (NA) para as análises das regiões Anon e EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*.....59
- Tabela 3. 3.** Índices de diversidade molecular para a região nuclear Anon em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*. Os índices foram calculados por localidade e na amostra como um todo (total). N – número de indivíduos; S – número de sítios polimórficos; Hap – número estimado de haplótipos;  $\pi$  – diversidade gênica média ao longo dos sítios;  $H_{obs}$  – heterozigozidade observada; e  $H_{esp}$  – heterozigozidade esperada. ....62
- Tabela 3. 4.** Índices de diversidade molecular para a região nuclear EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*. Os índices foram calculados por localidade e na amostra como um todo (total). N – número de indivíduos; S – número de sítios polimórficos; Hap – número estimado de haplótipos;  $\pi$  – diversidade gênica média ao longo dos sítios;  $H_{obs}$  – heterozigozidade observada; e  $H_{esp}$  – heterozigozidade esperada. ....63
- Tabela 3. 5.** Índice  $F_{ST}$  entre os pares de localidades de coleta em *Erythrodiplax fusca*. Os valores abaixo da diagonal são os índices  $F_{ST}$  para a região Anon e os valores acima, para a EF1 $\alpha$ . Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom

Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*” .....64

**Tabela 3. 6.** Índice  $F_{ST}$  entre os pares de localidades de coleta em *Orthemis discolor*. Os valores abaixo da diagonal são os índices  $F_{ST}$  para a região Anon e os valores acima, para a EF1 $\alpha$ . Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*” .....64

**Tabela 3. 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) para as regiões nucleares Anon e EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*. .....65

## RESUMO

QUEIROZ, Camila de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Estrutura populacional em *Erythrodiplax fusca* Rambur 1842 e *Orthemis discolor* Burmeister 1839 (Odonata: Libellulidae): Morfometria e marcadores moleculares nas questões microevolutivas.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Coorientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko e Evandro Marsola de Moraes.

A estrutura populacional pode ser entendida como a associação não aleatória de indivíduos em subgrupos, de modo que o acasalamento dentro de subpopulações é mais provável do que entre elas e o compartilhamento de novos alelos é menos frequente do que em uma população panmítica. A estrutura populacional de duas espécies de Libellulidae (Odonata) *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842) e *Orthemis discolor* (Burmeister, 1839) foi estudada com base em marcadores morfológicos e moleculares. A diferença morfológica entre as localidades de coleta em cada espécie foi abordada através da morfometria geométrica das asas, enquanto as diferenças genéticas foram avaliadas com base em polimorfismos de sequências de DNA nuclear, o que permitiu comparar a forma como diferentes marcadores podem indicar estruturação populacional. As duas espécies deste trabalho apresentaram estruturação morfológica, mas nenhuma evidência de estruturação genética, o que pode ser explicado pelo excesso de polimorfismo intraindividual (mais de uma cópia por indivíduo) nas duas regiões nucleares estudadas. Em *E. fusca*, as localidades de coleta foram divididas em dois grupos de forma que podem ser relacionados a dois grupos de altitude. Por outro lado, o agrupamento pela forma em *O. discolor* parece ser mais relacionado a outras condições ambientais.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Camila de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Population structure in *Erythrodiplax fusca* Rambur 1842 and *Orthemis discolor* Burmeister 1839 (Odonata: Libellulidae): Morphometry and molecular markers in microevolutionary questions.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisers: Karla Suemy Clemente Yotoko and Evandro Marsola de Moraes.

Population structure is the non-random association of individuals in subgroups. In this case, the mating within these subgroups is more likely than between them and new alleles are less frequent shared than in a panmitic population. The population structure of two species of Libellulidae (Odonata) *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842) and *Orthemis discolor* (Burmeister, 1839) was analyzed with morphological and molecular markers. The morphological difference between the sampling sites of each species was addressed by wing geometrics morphometrics and the genetic differences were evaluated based on polymorphisms of nuclear DNA sequences. This approach allows comparing how different markers discriminate population structure. The two species of this study showed morphological structure, but no genetic structure. An excess of intra-individual polymorphism (more than one copy per individual) in the two nuclear regions can explain the lack of genetic structure. In *E. fusca*, two shape groups are related to two groups of altitude. On the other hand, the two shape groups of *O. discolor* seem to be more related to other environmental conditions.

# INTRODUÇÃO GERAL

A evolução, definida como a alteração das frequências gênicas ao longo das gerações, é um processo populacional: tanto a interação entre os indivíduos quanto a interação destes com o ambiente ocorrem dentro de populações (Gingerich 2009). A estrutura populacional pode ser entendida como a associação não aleatória de indivíduos em subgrupos, de modo que o acasalamento dentro de subpopulações é mais provável do que entre elas e o compartilhamento de novos alelos é menos frequente que em uma população panmítica (onde qualquer indivíduo pode acasalar com qualquer outro do sexo oposto, de modo que novos alelos podem se espalhar rapidamente por toda a população). A estruturação populacional pode ser decorrente de barreiras ou longas distâncias geográficas, fatores comportamentais, capacidade de dispersão, entre outros. Neste caso, os novos alelos tendem a ser exclusivos de um subgrupo e aumentar de frequência dentro deste.

Animais alados têm maior potencial de locomoção do que os não alados, sendo excelentes modelos para estudos de estruturação populacional e do papel de diferentes barreiras no isolamento de subgrupos. As espécies de insetos da ordem Odonata estão entre os maiores insetos da comunidade de água doce (Heckman 2006). Em Odonata, a metamorfose é incompleta e as fases imaturas e adulta ocorrem em diferentes habitats. Os ovos são depositados na água pela fêmea logo após a cópula. As larvas então se desenvolvem na água doce e, logo antes da metamorfose, deixam o ambiente aquático pelo caule de plantas ou outros objetos, completando a metamorfose já no ambiente terrestre, com o desenvolvimento das asas e endurecimento do exoesqueleto. Na fase adulta e terrestre, apresentam cabeça grande, olhos e peças bucais mastigadoras bem desenvolvidos, antenas curtas e setiformes, quatro asas grandes e reticuladas e abdômen cilíndrico, cilíndrico ou deprimido (Rafael *et al.* 2002). O pico de atividade ocorre quando o sol está a pino, ao redor dos corpos de água doce, onde ocorre a cópula e a

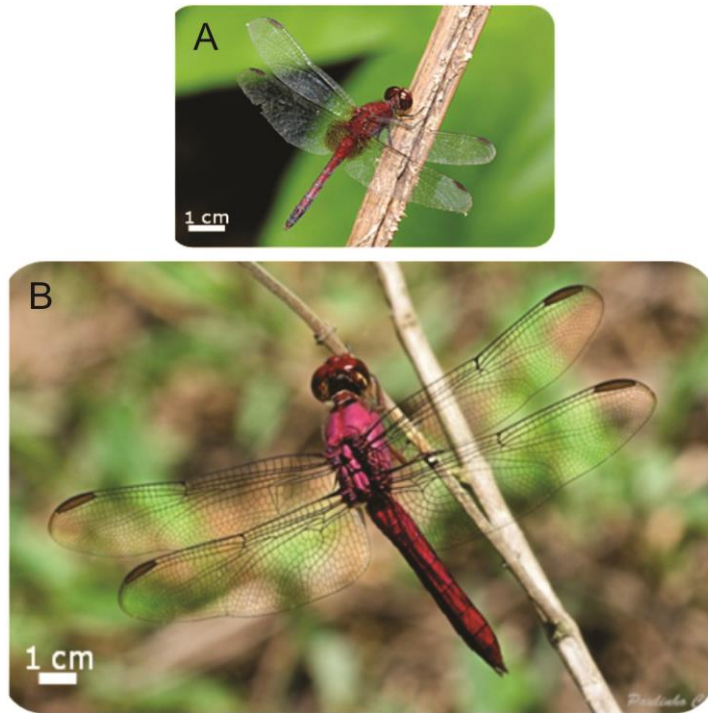
alimentação. Tanto as larvas quanto os adultos são predadores, se alimentando de outros insetos aquáticos (inclusive outras libélulas menores), larvas, girinos e alevinos (Heckman 2006). Este hábito predador das espécies de Odonata tem um impacto negativo nas pisciculturas, onde populações de jovens e pequenos alevinos podem ser dizimadas se não houver uma proteção adequada ao ataque destes predadores. Por outro lado, se manejadas adequadamente, muitas espécies de Odonata podem atuar como controle biológico de insetos prejudiciais à agricultura.

Neste trabalho, foram estudadas populações de duas espécies de Odonata (figura 1), *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842) e *Orthemis discolor* (Burmeister, 1839). Ambas espécies pertencem à família Libellulidae (Garrison *et al.* 2006), em que uma série de nervuras da asa posterior em forma de uma figura semelhante a uma bota (alça anal - figura 2) pode ser identificada em todas espécies desta família. Também, as duas espécies deste trabalho são incluídas na subfamília Libellulinae (Garrison *et al.* 2006), mas a proximidade filogenética entre os gêneros *Erythrodiplax* e *Orthemis* ainda é incerta, uma vez que esta subfamília pode não ser monofilética e estes dois gêneros ocupam ramos distintos dentro da família nas análises filogenéticas (Ware *et al.* 2007).

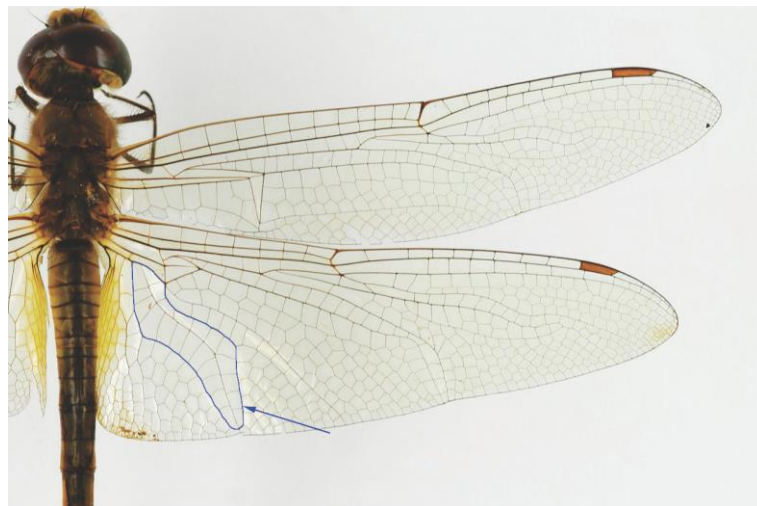
As duas espécies deste trabalho apresentam distribuição neotropical semelhante: *E. fusca* pode ser encontrada do estado do Texas nos Estados Unidos ao sul da Argentina e *O. discolor*, desde os estados americanos Arizona e Texas até o sul da Argentina (Paulson & Dunkle 1999).

As espécies de Odonata são geralmente classificadas em duas categorias de acordo com o comportamento de voo: os chamados voadores ou “fliers”, espécies que, quando em atividades de forrageio ou reprodução, permanecem em voo; e os chamados pousadores ou “perchers”, que, durante as mesmas atividades, passam a maior parte do tempo pousados em poleiros, de onde saem para realizar

voos curtos (Corbet 1983). Tanto *E. fusca* quanto *O. discolor* são classificadas como pousadoras (Corbet 1983). Contudo, a divisão em pousadoras e voadoras leva em consideração apenas o fato de que as espécies denominadas voadoras nunca são vistas pousadas e não há discriminação quanto à habilidade de dispersão das pousadoras, que é muito variável.



**Figura 1.** Espécies estudadas, A - *Erythrodiplax fusca* e B – *Orthemis discolor*.



**Figura 2.** Asas anterior e posterior direita de um Libellulidae. A alça anal está destacada com contorno em azul e indicada pela seta. Foto modificada a partir de W. Y. Chen (<http://www.imdap.entomol.ntu.edu.tw>).

Observações feitas em campo pelo nosso grupo de pesquisa durante as coletas sugerem que *E. fusca* é uma espécie que passa muito mais tempo pousada do que *O. discolor*, além de percorrer trechos menores durante o voo. Outra diferença entre estas duas espécies é o tamanho corporal: *O. discolor* é aproximadamente duas vezes maior que *E. fusca*. Ainda, os machos de *O. discolor* defendem amplos territórios, são bastante agressivos com outros machos de sua própria espécie, e preferem sítios de pouso mais altos, o que pode ser resultado da baixa discriminação dos sítios de oviposição pelas fêmeas (Marco Jr & Resende 2004). Já os machos de *E. fusca* defendem territórios menores e pousam em vegetação mais baixa (observações pessoais). A diferença na capacidade de voo observada em campo se reflete inclusive na amostragem das duas espécies. Uma vez que *O. discolor* é mais ativa, a coleta com rede entomológica dessa espécie é muito mais difícil, resultando em menor número de indivíduos capturados (86, contra 175 de *E. fusca*) durante os mesmos períodos de coleta.

O objetivo geral deste estudo foi comparar a estruturação populacional de duas espécies com diferentes comportamentos no sítio reprodutivo. As diferenças dentro e entre populações para as duas espécies foram avaliadas com marcadores morfológico e molecular, buscando relacioná-las à distribuição dos indivíduos no espaço e comparar o poder de discriminação de diferentes ferramentas na detecção de estruturação populacional.

A primeira hipótese trabalhada foi relacionada às diferenças no comportamento de voo, principalmente em relação à menor mobilidade observada em *E. fusca*: espera-se que esta espécie apresente maior estruturação populacional do que *O. discolor*, já que em espécies com menor capacidade de dispersão, os indivíduos tendem a ficar restritos aos locais de nascimento ou corpos d'água próximos. Além do isolamento devido à distância geográfica, os pontos amostrados permitiram avaliar o isolamento em decorrência de uma barreira de altitude, a Serra

do Brigadeiro. A Serra do Brigadeiro ocupa o extremo norte da Serra da Mantiqueira, na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, e atua como um divisor de águas, abastecendo as bacias do Rio Doce e do Rio Paraíba do Sul (Rolim & Ribeiro 2001). As localidades de coleta são separadas em dois grupos distintos por esta barreira: um a leste e outro a oeste da Serra do Brigadeiro. Caso a barreira de altitude seja mais efetiva do que a distância geográfica entre as localidades na estruturação das populações, espera-se mais semelhanças morfológicas e genéticas entre as localidades de cada lado da Serra do Brigadeiro do que entre populações mais próximas geograficamente.

Duas ferramentas foram usadas para analisar a estruturação populacional, a morfometria geométrica das asas e a análise genética de dois loci nucleares. Dessa forma, é possível comparar como diferentes marcadores, sensíveis a diferentes questões evolutivas, podem discriminar a formação de subgrupos dentro de uma espécie. A morfometria agrega informações para o estudo das variações em diferentes populações e espécies que não podem ser acessadas com as análises tradicionais dos marcadores moleculares neutros, como a plasticidade fenotípica e as evidências de seleção natural. A plasticidade fenotípica e as restrições seletivas podem mascarar a estruturação populacional, isto é, as populações amostradas podem ser similares morfológicamente mesmo que não haja migração significativa entre elas e os subgrupos estejam isolados. Por isso, além da variação morfológica, foi analisada a variação genética em ambas espécies, através de regiões de DNA nuclear. Marcadores moleculares não sofrem influência direta do ambiente e a variação encontrada é assumidamente neutra, além de possibilitarem estimar o fluxo gênico entre populações e apresentarem maior variabilidade.

A tese foi dividida em três capítulos. O primeiro trata as diferenças de tamanho do centroide e forma das asas entre as localidades de coleta de *E. fusca* e *O. discolor*. O segundo capítulo aborda um dos problemas encontrados na

execução das análises genéticas com marcadores mitocondriais, a existência de NUMTS (sequências mitocondriais que migraram para o genoma nuclear) em *E. fusca*. O último capítulo traz as análises genéticas realizadas, ressaltando as dificuldades encontradas na obtenção de marcadores adequados às questões propostas, na amostragem e na obtenção de sequências com qualidade.

CAPÍTULO 1 – MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS  
ASAS DE *ORTHEMIS DISCOLOR* E *ERYTHRODIPLAX FUSCA*

## Introdução

A estruturação populacional é tipicamente estudada com marcadores moleculares, que apresentam variação neutra. Entretanto, a variação morfológica também pode ser uma ferramenta nos estudos intraespecíficos, pois agrega informações relevantes sobre as respostas às variáveis ambientais.

A morfometria associa o estudo da forma e tamanho de uma estrutura biológica com o estudo estatístico das variações encontradas. A morfometria geométrica é um ramo da morfometria que busca investigar as variações da forma de modo independente do tamanho. Segundo Bookstein (1997), o objeto da morfometria geométrica não se restringe somente às formas, inclui também as suas associações, causas e efeitos. Para a morfometria geométrica, é necessário que sejam marcados pontos de referência adequados, isto é, pontos que além de possuírem coordenadas cartesianas também sejam homólogos entre os diferentes indivíduos (Monteiro & Reis 1999). Este pontos são os chamados marcos anatômicos, que podem ser facilmente identificados nas asas de Odonata através do padrão de venação alar, uma vez que algumas regiões típicas estão presentes em todos as espécies da ordem, como o pterostigma e a alça anal.

A análise morfométrica se destaca como alternativa no estudo de populações devido ao seu baixo custo e facilidade de execução. Esta ferramenta permite a coleta de um grande volume de dados em laboratórios de tamanho reduzido e requer pouco investimento em equipamentos e programas de computador para análises dos dados.

Em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), por exemplo, a plasticidade fenotípica foi investigada em resposta a diferentes fatores, como temperatura, sexo e densidade populacional (Bitner-Mathe & Klaczko 1999). Já a mudança morfológica como resposta adaptativa a um gradiente de altitude foi

estudada em *Tecia solanivora* (Lepidoptera, Hernández-L *et al.* 2010) e em *Aedes vexans* (Diptera, Kuclu *et al.* 2011). Os trabalhos populacionais em Odonata são escassos e restritos à subordem Zygoptera (Hassall *et al.* 2007; Herrera *et al.* 2010; Outomuro & Johansson 2011; Bots *et al.* 2012).

O objetivo principal deste capítulo foi identificar diferenças na forma e tamanho das asas dos indivíduos em diferentes localidades para duas espécies de Odonata da subordem Anisoptera, *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* (Libellulidae). Ainda, este trabalho pretende destacar o papel da morfometria geométrica nos estudos de estruturação populacional.

## **Material e Métodos**

### *Amostras e coleta*

As coletas foram realizadas em cinco localidades do estado de Minas Gerais (tabela 1.1, figuras 1.1 e 1.2) entre os meses de dezembro e fevereiro dos anos de 2010 e 2012. Em cada localidade, foram coletados somente machos, amostrados de um único corpo d'água. A diferença na capacidade de voo entre as duas espécies interferiu na amostragem. *O. discolor* é uma espécie muito mais ativa ao redor dos sítios reprodutivos, alçando voos longos e rápidos, o que a torna uma espécie mais difícil de ser capturada. Assim, a amostragem para *O. discolor* é aproximadamente metade (86) da amostragem para *E. fusca* (175). As asas danificadas durante a coleta e transporte dos indivíduos foram descartadas da amostra: em *E. fusca* 20 para a asa anterior e 24 para a posterior; e em *O. discolor*, 10 para a anterior e 11 para a posterior. O tamanho final da amostra de cada espécie por localidade está discriminado na tabela 1.1.

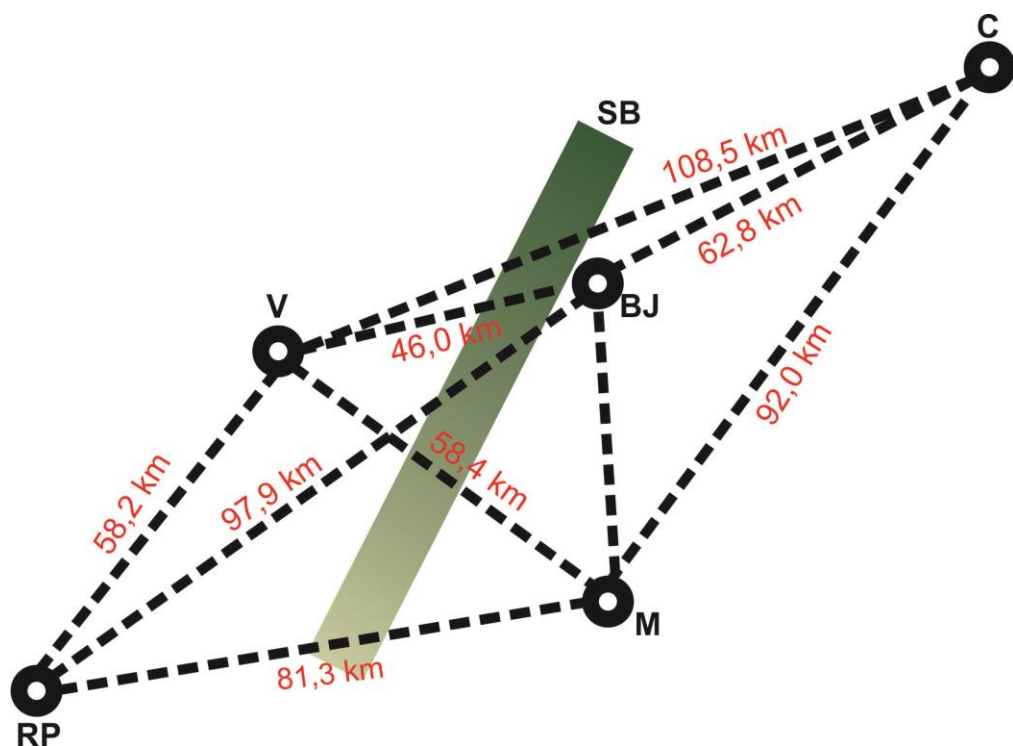
**Tabela 1. 1.** Localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* no estado de Minas Gerais. N<sub>AA</sub> – tamanho da amostra utilizada para as análises morfométricas da asa anterior; N<sub>AP</sub> – tamanho da amostra para as análises morfométricas da asa posterior.

Espécie	Localidade	Latitude	Longitude	Altitude	N <sub>AA</sub>	N <sub>AP</sub>
<i>E. fusca</i>						
	Alto Caparaó	20°26'34"S	41°51'45"O	993 m	20	23
	Bom Jesus do Madeira	20°43'10"S	42°23'26"O	863 m	35	36
	Muriaé	21°07'37"S	42°22'01"O	169 m	45	40
	Rio Pomba	21°15'00"S	43°08'00"O	540 m	30	31
	Viçosa	20°49'01"S	42°49'56"O	727 m	25	21
	Total	-	-	-	155	151
<i>O. discolor</i>						
	Bom Jesus do Madeira	20°43'10"S	42°23'26"O	863 m	14	15
	Muriaé	21°07'37"S	42°22'01"O	169 m	18	16
	Rio Pomba	21°15'00"S	43°08'00"O	540 m	16	16
	Viçosa	20°45'27"S	42°51'37"O	727 m	28	28
	Total	-	-	-	76	75

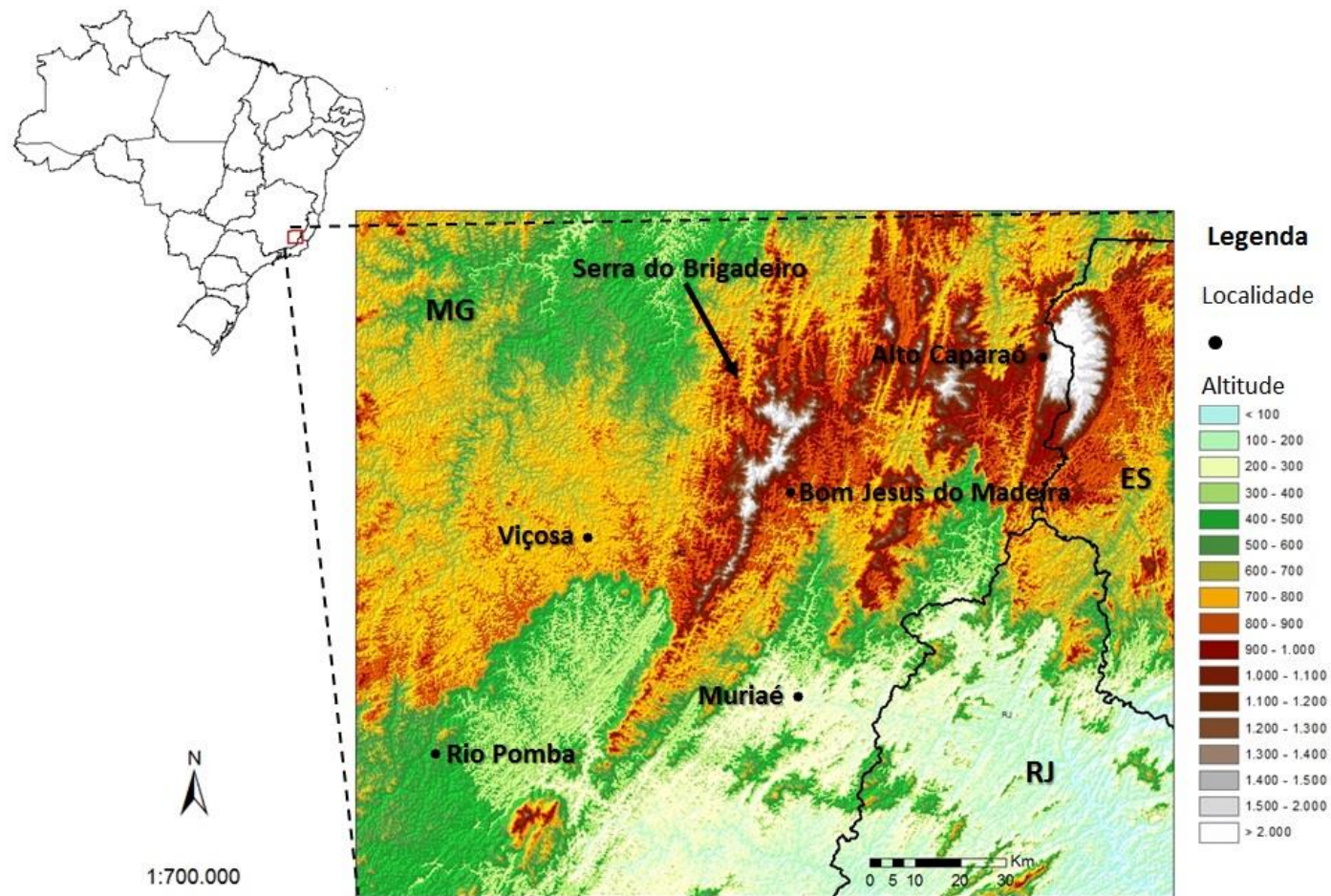
Os pares de localidades amostradas apresentam diferentes distâncias geográficas, que variam de 46,0 km, distância entre Bom Jesus do Madeira e Viçosa, a 108,5 km, entre Alto Caparaó e Viçosa (figuras 1.1 e 1.2). Desta forma, as populações foram comparadas par a par e as diferenças morfológicas, correlacionadas às distâncias geográficas (figura 1.1). Também foi considerada a barreira topográfica constituída pela Serra do Brigadeiro, que divide as localidades amostradas em dois grupos: um ao leste da barreira (Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira e Muriaé) e outro a oeste (Viçosa e Rio Pomba). Deve ser ressaltado ainda que as localidades escolhidas permitem relacionar as diferenças morfológicas das asas em função de um gradiente de altitude, de 540 m (localidade de Rio Pomba) a 993 m (localidade de Alto Caparaó). As diferentes localidades diferiram também quanto às paisagens: as lagoas de Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira e Rio Pomba são reservatórios para hidratação de gado, com alta concentração de matéria orgânica, em áreas abertas e de água parada. Embora seus aspectos sejam semelhantes, apenas um indivíduo de *O. discolor* foi observado no Alto

Caparaó durante as coletas e, logo, não há amostragem para essa espécie nesta localidade. Em Muriaé, as coletas foram realizadas em um trecho de água corrente, mas também em área aberta e próximo a criação de gado. Já em Viçosa, *E. fusca* foi coletada em uma lagoa de pesca situada em uma área aberta e *O. discolor* em uma lagoa na borda de mata, cada uma dessas lagoas continha apenas uma das duas espécies em estudo.

Os indivíduos foram capturados com rede entomológica e, em seguida, mortos e armazenados em álcool comercial 92,8° GL à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório. Posteriormente, as quatro asas de cada indivíduo foram retiradas e organizadas em cartões para a análise morfométrica e o restante do corpo armazenado em álcool comercial a -20 °C.



**Figura 1.** 1. Distância em quilômetros (km) entre as localidades de coleta. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude.



**Figura 1. 2.** Distribuição das localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* (Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira, Muriaé, Rio Pomba e Viçosa) no mapa altimétrico regional. A seta indica a Serra do Brigadeiro.

### *Digitalização das asas*

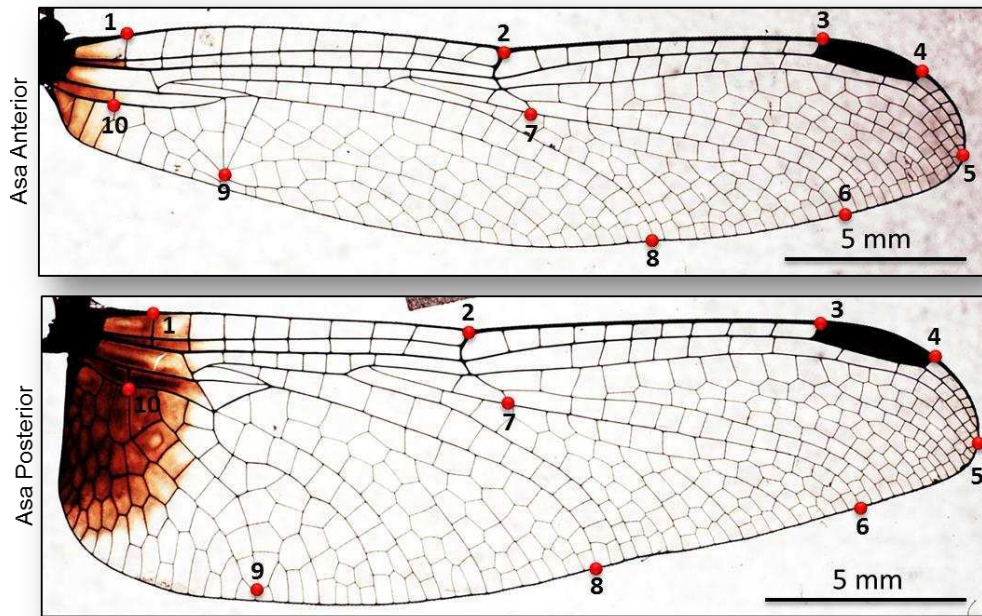
As asas esquerdas, anteriores e posteriores de cada indivíduo foram fotografadas com câmera Nikon D90 e lente macro Nikon SWM VR ED IF Micro 1:1 ø62 Nano Crystal Coat. Cada asa foi fotografada em conjunto com escala de 5 mm, para ser usada como base no cálculo de tamanho. As imagens foram importadas no programa tpsDig 2.0 (Rohlf 2005) para a marcação dos marcos anatômicos. Foram escolhidos 10 marcos anatômicos para as asas anteriores e 10 para as posteriores (tabela 1.2 e figuras 1.3 e 1.4), sendo os mesmos marcos adotados em *E. fusca* e *O. discolor*. Entre os 10 marcos escolhidos para cada asa, dois são do tipo I, isto é, marcos definidos pelo encontro de três estruturas anatômicas, e oito são do tipo II, definidos pelo encontro de uma estrutura anatômica com a margem (Bookstein 1997). Ambos os tipos de marcos anatômicos escolhidos são facilmente identificados através da interseção das veias alares (tabela 1.2). Foram formados dois conjuntos de dados para análise, um contendo as configurações (isto é, conjunto de marcos anatômicos de uma forma) das asas anteriores e outro das asas posteriores, que foram analisados separadamente.

As câmeras fotográficas possuem lentes esféricas, o que pode resultar numa ligeira deformação dos objetos capturados, efeito mais pronunciado em distâncias focais curtas (Claude 2008) e que pode aumentar artificialmente a diferença de forma entre indivíduos. Os erros de digitalização das imagens foram testados com duas fotografias de cada asa em dois indivíduos de cada localidade. Também foram testados os erros decorrentes da sensibilidade na determinação dos marcos anatômicos nas imagens. Para isto, cada fotografia dos indivíduos usados no teste de erro de digitalização foi submetida a duas marcações independentes. Nestes dois testes de erro, cada marcação foi tratada como um componente independente na amostra e o conjunto de dados submetido à análise de

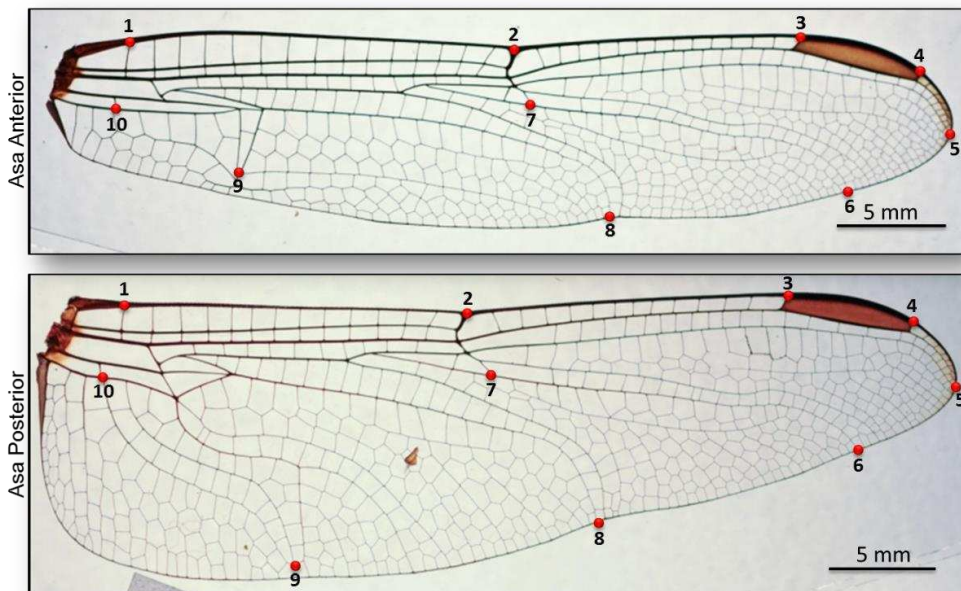
componentes principais. Tanto em *E. fusca* quanto em *O. discolor* os pontos das diferentes fotos e diferentes marcações do mesmo indivíduo ficaram sobrepostos, indicando que estes dois tipos de erro foram mínimos dentro do conjunto de dados e que não houve deformação pela lente utilizada.

**Tabela 1. 2.** Descrição dos marcos anatômicos escolhidos para *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*. A nomenclatura das nervuras segue a proposta de Needham (1903) modificada por Borror (1945), conforme a ilustração em Heckman (2006).

Marco Anatômico	Descrição
<b>Asa Anterior</b>	
1	Encontro entre a nervura costal (C) e a nervura antenodal 1
2	Nó
3	Encontro entre a margem e a nervura postnodal 10 (pterostigma)
4	Encontro entre a margem e a nervura postnodal 11 (pterostigma)
5	Encontro entre a margem e a nervura do setor principal M <sub>1</sub>
6	Encontro entre a margem e a nervura do setor radial R <sub>s</sub>
7	Encontro entre a nervura oblíqua e a nervura do setor radial R <sub>s</sub>
8	Encontro entre a margem e a nervura do setor mediano M <sub>3</sub>
9	Encontro entre os vértices do triângulo e subtriângulo
10	Encontro entre a quinta nervura que parte da base da asa e a primeira nervura transversal entre a quarta e quinta nervura que partem da base da asa.
<b>Asa Posterior</b>	
1	Encontro entre a nervura costal (C) e a nervura antenodal 1
2	Nó
3	Encontro entre a margem e a nervura postnodal 10 (pterostigma)
4	Encontro entre a margem e a nervura postnodal 11 (pterostigma)
5	Encontro entre a margem e a nervura do setor principal M <sub>1</sub>
6	Encontro entre a margem e a nervura do setor radial R <sub>s</sub>
7	Encontro entre a nervura oblíqua e a nervura do setor radial R <sub>s</sub>
8	Encontro entre a margem e a nervura do setor mediano M <sub>3</sub>
9	Ponta da alça anal
10	Encontro entre a quinta nervura que parte da base da asa e a primeira nervura transversal entre a quarta e quinta nervura que partem da base da asa.



**Figura 1. 3.** Representação dos 10 marcos anatômicos escolhidos para as asas anterior e posterior de *Erythrodiplax fusca*.



**Figura 1. 4.** Representação dos 10 marcos anatômicos escolhidos para as asas anterior e posterior de *Orthemis discolor*.

### *Análise da variação no tamanho do centroide das asas*

A variação no tamanho das asas dos indivíduos entre as localidades foi avaliada a partir do tamanho do centroide nas configurações. O tamanho do centroide é a medida dada pela raiz quadrada do somatório do quadrado da distância de cada marco anatômico ao centroide, o centro geométrico da figura (Monteiro & Reis 1999). Inicialmente, as configurações dadas pelos marcos anatômicos foram padronizadas para a mesma orientação e direção no programa MorphoJ 1.04b (Klingenberg 2011). Em seguida, o tamanho do centroide de cada asa foi determinado neste mesmo programa.

Antes do início das análises, a normalidade de cada conjunto de dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias entre as localidades de coleta pelo teste de Levene. As diferenças de tamanho entre as localidades foram estudadas através da simplificação de modelos explicativos por análise de contrastes no programa livre R (R Development Core Team 2008), adotando o nível de significância igual a 0,05.

O primeiro modelo considerado foi a inclusão dos indivíduos de cada localidade em um grupo isolado, sendo formado então por cinco grupos nas análises de *E. fusca* e quatro grupos em *O. discolor*. A simplificação subsequente foi feita com a amalgamação das duas localidades com médias mais próximas em um único grupo. Deste modo, o segundo modelo contém um grupo a menos do que o modelo inicial. Os modelos foram então comparados pela ANOVA e teste F. Quando não houve diferença significativa entre os modelos, optou-se pelo mais simples, isto é, o modelo com menor número de grupos e menor resíduo. Nesse caso, um terceiro modelo com número menor de grupos era formulado com base nas médias das localidades e comparado ao segundo pela ANOVA e teste F. Este procedimento foi repetido até que os modelos comparados apresentassem

diferenças significativas e o último modelo mais simples fosse descartado, restando o modelo com maior percentual de explicação da variação. A adequação do modelo mais simples escolhido foi verificada pela análise gráfica dos resíduos.

#### *Análise da variação na forma das asas*

Depois de definidos os tamanhos do centroide, as configurações dadas pelos marcos anatômicos foram padronizadas pela superposição de Procrustes no programa MorphoJ 1.04b (Klingenberg 2011), isto é: i – foram redimensionadas para ter tamanho do centroide igual a 1; ii – foram colocadas em mesma orientação e direção; e iii – tiveram a configuração consenso ajustada pelo método de mínimos quadrados ortogonais, que minimiza o somatório do quadrado da distância de cada marco anatômico ao seu correspondente na configuração consenso.

A projeção do espaço de forma de Kendall, uma superfície geodésica, no espaço tangente (linear) é necessária para o uso de métodos estatísticos padrão para a análise multivariada. A correlação linear entre estes dois espaços foi confirmada no tpsSmall v1.28 (Rohlf 2013) para todos os conjuntos de dados analisados. A variação na forma das asas foi estudada a partir das análises de deformações relativas com auxílio do programa tpsRelw 1.49 (Rohlf 2010). A normalidade de cada componente de deformação relativa foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homocedasticidade entre as localidades de coleta foi conferida com o teste de Levene. A análise de variância multivariada (MANOVA) foi conduzida com os componentes de deformação relativa suficientes para conter 80% da variação encontrada. O agrupamento das localidades com formatos semelhantes foi testado através da análise de contrastes e simplificação de modelos da mesma forma descrita para a variação no tamanho das asas. Estas

análises estatísticas foram conduzidas no programa livre R (R Development Core Team 2008), adotando o nível de significância igual a 5%.

A variação na forma das asas entre as localidades também foi investigada com a distância de Procrustes entre os pares de localidades e análise de variáveis canônicas no MorphoJ 1.04b (Klingenberg 2011), com  $10^6$  permutações. A significância dos grupos de forma dados pela MANOVA e distâncias de Procrustes e dos grupos de tamanho do centroide foi testada com a análise discriminante implementada no MorphoJ e  $10^6$  permutações. Os gráficos para visualizar as diferenças de forma entre os grupos foram preparados no R, de acordo com o protocolo descrito por (Zelditch *et al.* 2004) no capítulo "Visualizing Shape Changes".

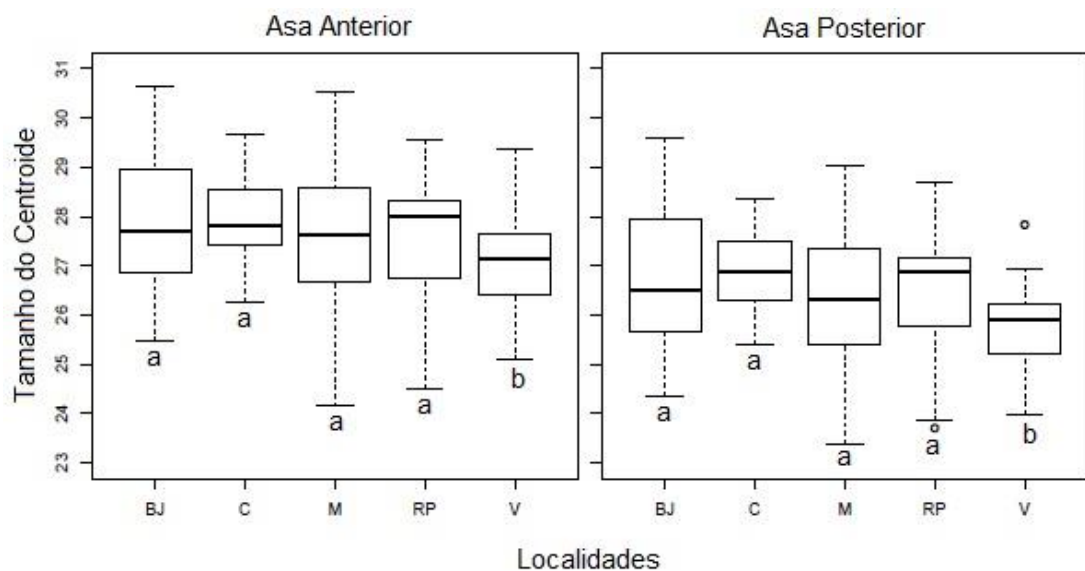
## **Resultados**

### *Varição no tamanho do centroide entre as localidades*

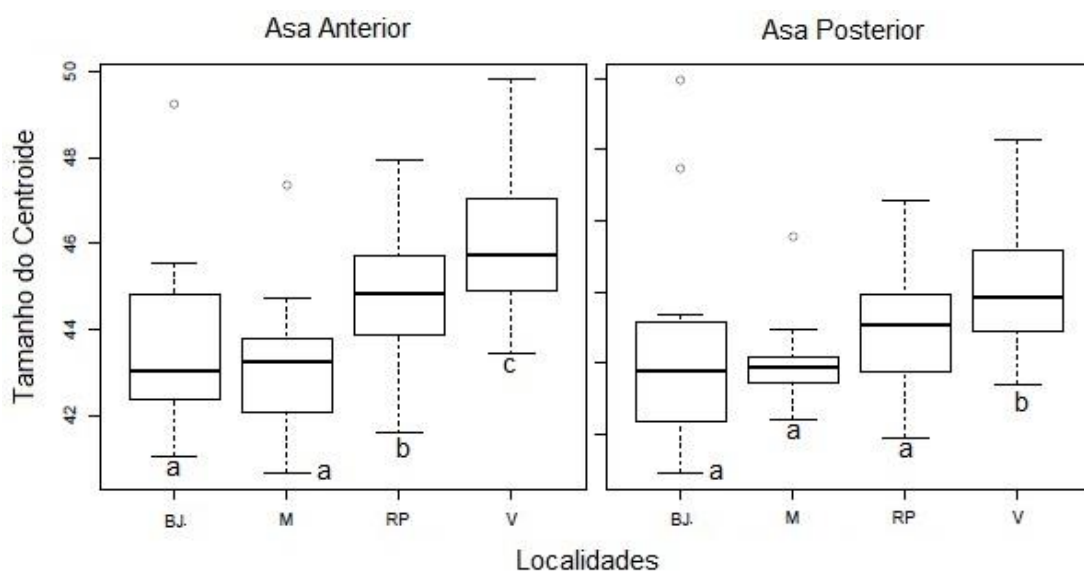
Em *E. fusca*, o tamanho do centroide distinguiu dois grupos em ambas as asas ( $F_{(1,153)} = 4,8563$ ,  $p = 0,02904$  na asa anterior; e  $F_{(1,149)} = 8,1188$ ,  $p = 0,005001$  na posterior): o primeiro composto pelas amostras coletadas em Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba (não houve diferença significativa no tamanho das asas anteriores  $F_{(1,152)} = 0,89$ ,  $p = 0,347$  e posteriores  $F_{(1,148)} = 0,5513$ ,  $p = 0,459$  dentro deste grupo) e o segundo composto pelas amostras coletadas em Viçosa (figura 1.5).

A análise do tamanho do centroide em *O. discolor* resultou em diferentes padrões de agrupamento para as asas anteriores e posteriores. As localidades amostradas foram divididas em três grupos de acordo com o tamanho das asas anteriores ( $F_{(1,73)} = 8,1183$ ,  $p = 0,005691$ ). O primeiro grupo inclui indivíduos das

localidades de Bom Jesus do Madeira e Muriaé, que não apresentaram diferenças significativas ( $F_{(1,72)} = 0,4298$ ;  $p = 0,5142$ ) e com os indivíduos com o menor tamanho entre todas localidades (figura 1.6). O segundo grupo contém apenas indivíduos de Rio Pomba e o terceiro de Viçosa, sendo os indivíduos com tamanho de asa anterior médio e grande, respectivamente (figura 1.6). Para a asa posterior, foram formados apenas dois grupos de tamanho ( $F_{(1,73)} = 20,565$ ;  $p = 2,213e-05$ ). Indivíduos coletados em Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba formam o grupo com asas posteriores menores ( $F_{(1,72)} < 3,1851$ ;  $p = 0,0785$ ), enquanto os indivíduos coletados em Viçosa possuem asas maiores (figura 1.6).



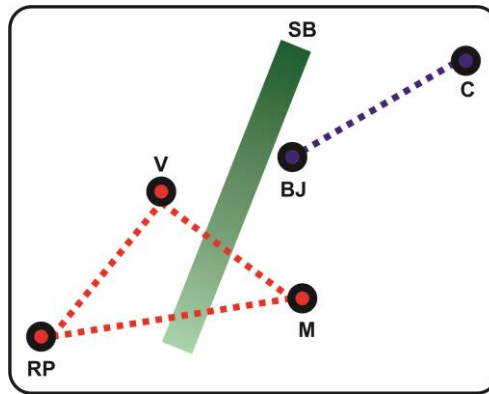
**Figura 1. 5.** Variação entre as localidades de coleta de *Erythrodiplax fusca* no tamanho do centroide das asas anteriores e posteriores. Letras iguais em baixo de cada “box” indicam as localidades que puderam ser amalgamadas na comparação de modelos pela análise de contrastes e, portanto, não apresentam médias significativamente diferentes. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa.



**Figura 1. 6.** Variação entre as localidades de coleta de *Orthemis discolor* no tamanho do centroide das asas anteriores e posteriores. Letras iguais em baixo de cada “box” indicam as localidades que puderam ser amalgamadas na comparação de modelos pela análise de contrastes e, portanto, não apresentam médias significativamente diferentes. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa.

#### *Variação na forma da asa entre as localidades*

Os sete primeiros componentes de deformação relativa das asas anteriores em *E. fusca* somaram 84,38% da variação e foram usados para a comparação de modelos pela MANOVA. Para as asas posteriores, também foram usados os sete primeiros componentes, com 84,17% da variação acumulada. Os mesmos dois grupos de forma foram identificados para as asas anteriores ( $F_{(1,153)} = 6,6727$ ,  $p = 7,309e-07$ ) e posteriores ( $F_{(1,149)} = 4,3001$ ,  $p = 0,0002406$ ). O primeiro grupo inclui indivíduos das localidades de Muriaé, Rio Pomba e Viçosa e o segundo, de Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira, representados no esquema da figura 1.7. A análise apenas do primeiro componente de deformação relativa, que contém 24,26% da variação na asa anterior e 22,04% na posterior, também resultou neste mesmo padrão de agrupamento das localidades ( $F_{(1,153)} = 20,893$ ,  $p = 9,947e-06$ , asa anterior, e  $F_{(1,149)} = 8,9851$ ,  $p = 0,00319$ , asa posterior).

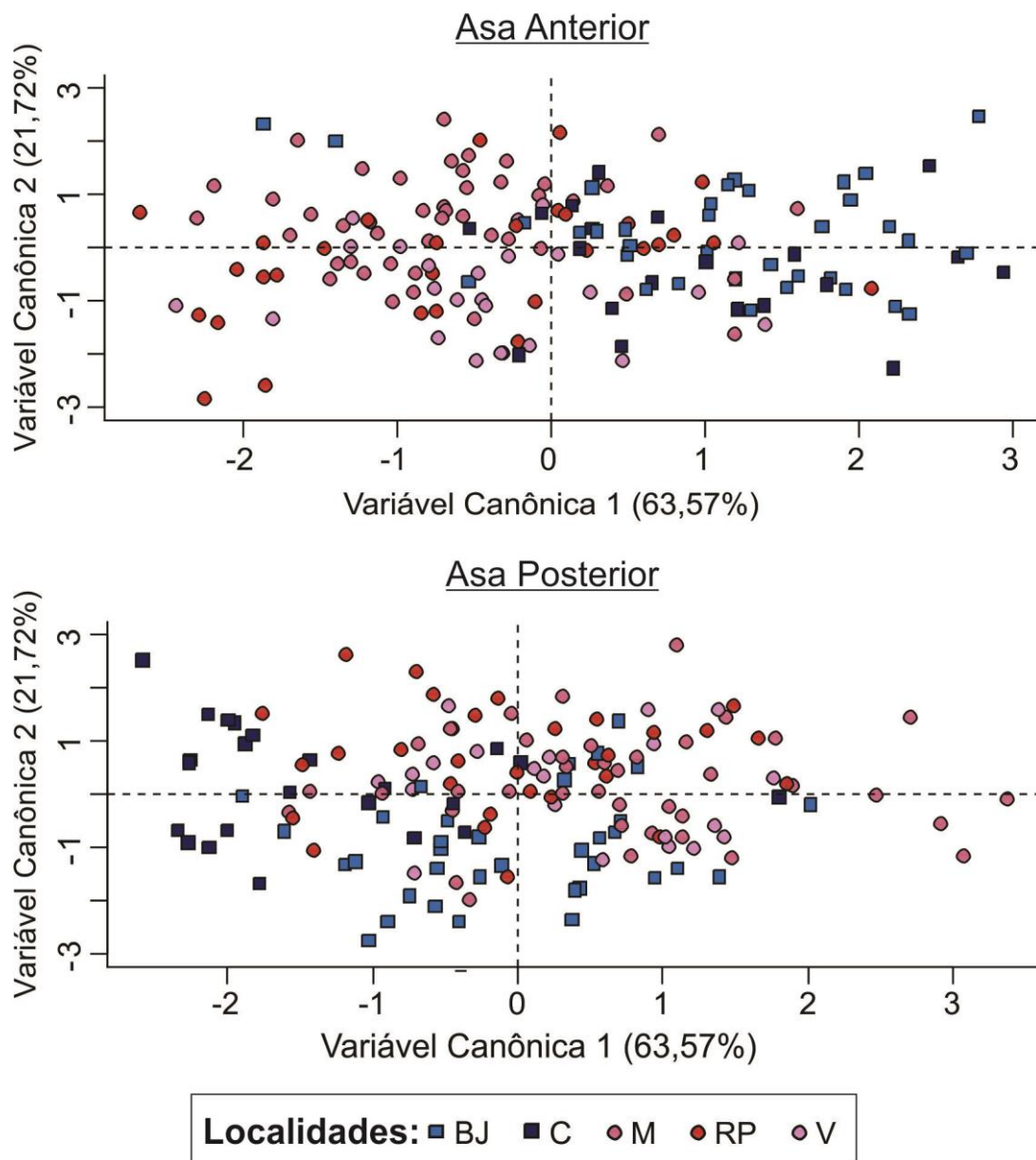


**Figura 1. 7.** Representação esquemática dos dois grupos de forma dados pela MANOVA das deformações relativas em *Erythrodiplax fusca* para ambas as asas. As localidades pertencentes ao mesmo grupo de forma estão ligadas por linhas tracejadas de mesma cor. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude.

As distâncias de Procrustes entre os pares de localidade confirmam o agrupamento dado pelas deformações relativas em *E. fusca*, exceto por uma diferença na asa posterior (tabela 1.3), que agrupa os indivíduos de Alto Caparaó e Rio Pomba. Na análise gráfica das variáveis canônicas, também é possível notar a separação dos dois grupos de forma ao longo do eixo da primeira variável canônica, embora essa separação seja menos evidente na asa posterior (figura 1.8).

**Tabela 1. 3.** Distância de Procrustes entre as localidades de coleta em *Erythrodiplax fusca*. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias para a asa anterior e os valores acima, para a posterior. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Distâncias significativas ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*”.

	BJ	C	M	RP	V
BJ	-	0,0049	0,0076*	0,0078*	0,0076*
C	0,0033	-	0,0072*	0,0057	0,0073*
M	0,0081*	0,0087*	-	0,0050	0,0046
RP	0,0074*	0,0081*	0,0038	-	0,0060
V	0,0066*	0,0071*	0,0049	0,0033	-



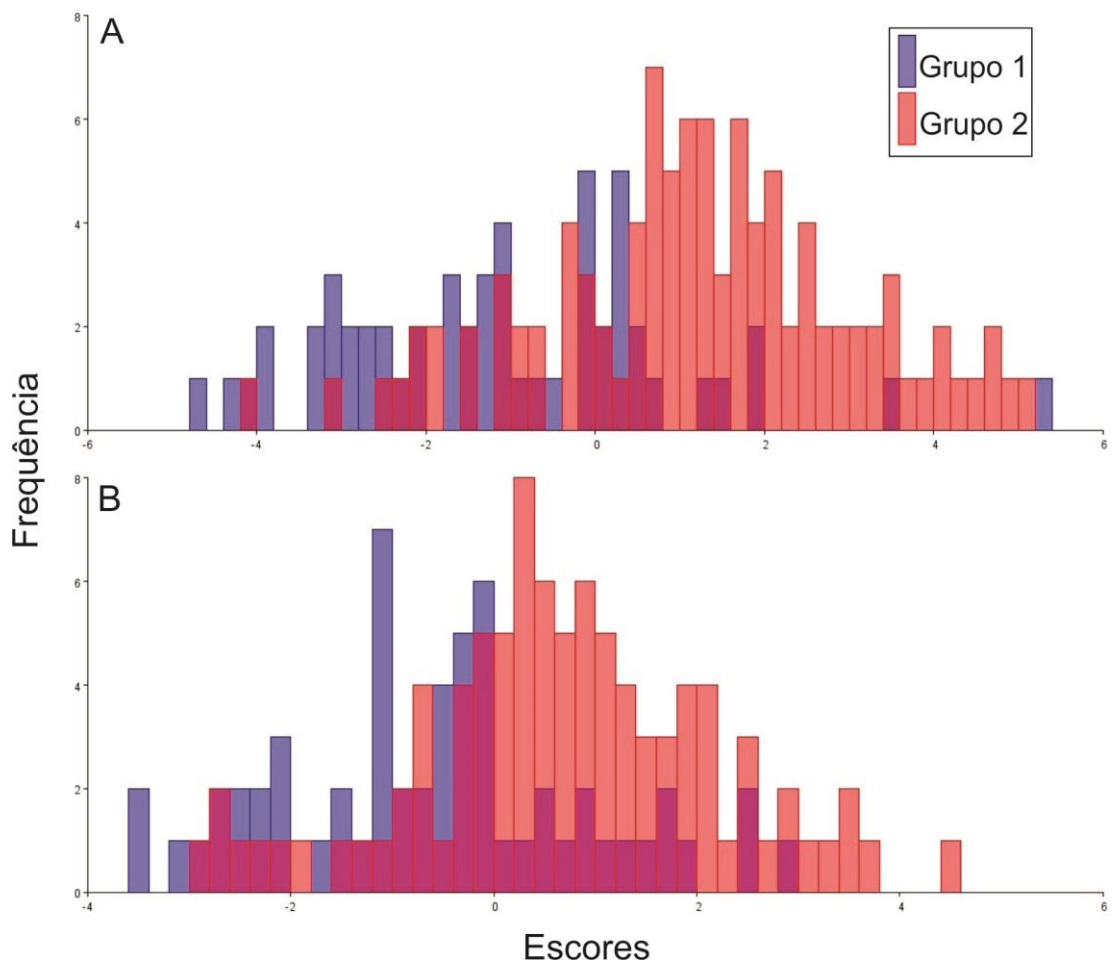
**Figura 1. 8.** Análise gráfica da primeira e segunda variáveis canônicas em *Erythrodiplax fusca* para a asa anterior e posterior, com a porcentagem de explicação de cada variável entre parênteses. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Os grupos de forma identificados pela MANOVA das deformações relativas e distância de Procrustes estão representados por pontos do mesmo tipo: grupo 1 (Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira) – quadrados em tons de azul; grupo 2 (Muriaé, Rio Pomba e Viçosa) – círculos em tons de vermelho.

O primeiro agrupamento testado pela análise discriminante foi o agrupamento dado pelo tamanho do centroide, em que um grupo contém as localidades de Alto Caparaó, Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba e o outro grupo a localidade de Viçosa. A diferença entre estes dois grupos não foi significativa tanto nas asas anteriores ( $p = 0,1131$ ) quanto nas asas posteriores ( $p = 0,1816$ ). O segundo padrão testado na análise discriminante foi a divisão dos dois grupos de forma de acordo com a MANOVA dos componentes de deformação relativa e suportado pelas distâncias de Procrustes entre os pares de localidades: um grupo formado pelas localidades de Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira e o outro por Muriaé, Rio Pomba e Viçosa. Este segundo padrão de agrupamento testado apresentou diferenças significativas em ambas as asas ( $p < 0,0001$ ), sendo que 74,19% dos indivíduos foram corretamente classificados em seus grupos na asa anterior e 72,84 % na asa posterior (figura 1.9).

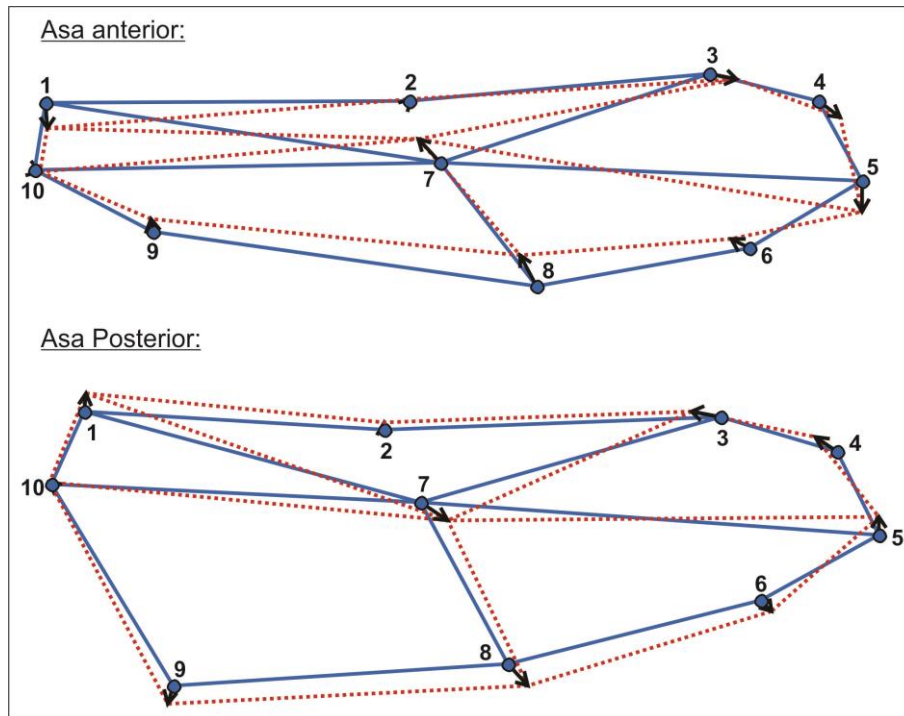
Os marcos anatômicos 1, 5, 7 e 8 concentram as maiores diferenças entre os dois grupos de forma na asa anterior de *E. fusca* (figura 1.10). De modo geral, as asas anteriores dos indivíduos de Muriaé, Rio Pomba e Viçosa são mais estreitas do que as de Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira, principalmente na região mais próxima ao tórax (lado esquerdo da figura 1.10). Já as diferenças nas asas posteriores entre os dois grupos é mais sutil, sendo as asas dos indivíduos do grupos de Muriaé, Rio Pomba e Viçosa mais largas do que as do outro grupo (figura 1.10).

Em *O. discolor*, a variação na forma foi representada pelos seis primeiros componentes de deformação relativa para as asas anteriores (82,91 % da variação) e pelos cinco primeiros para as asas posteriores (80,69 % da variação). As localidades foram divididas em dois grupos de forma de acordo com a MANOVA das deformações relativas das asas anteriores ( $F_{(1,74)} = 3,6224$ ;  $p = 0,003504$ ) e posteriores ( $F_{(1,73)} = 7,0659$ ;  $p = 2,195e-05$ ). O primeiro grupo inclui indivíduos das

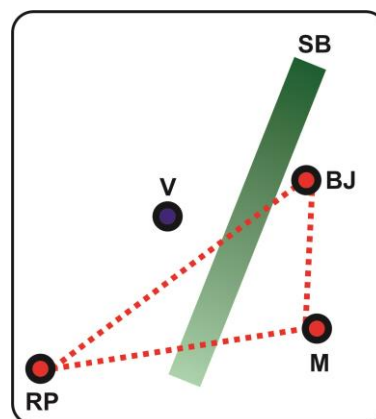
localidades de Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba e o segundo é formado exclusivamente por indivíduos de Viçosa (figura 1.11). As localidades também foram separadas deste modo na análise do primeiro componente de deformação relativa, que explica 28,01% da variação para asa anterior e 28,07% para asa posterior ( $F_{(1,74)} = 9,5279$ ;  $p = 0,002847$ , asa anterior, e  $F_{(1,73)} = 27,84$ ;  $p = 1,297e-06$ , asa posterior).



**Figura 1. 9.** Histograma dos escores de validação cruzada obtidos na análise discriminante em *Erythrodiplax fusca*. O grupo 1 é formado pelas localidades de Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira e o grupo 2 por Muriaé, Rio Pomba e Viçosa, conforme indicado pela MANOVA das deformações relativas e distâncias de Procrustes.



**Figura 1. 10.** Diferenças de forma das asas em *Erythrodiplax fusca* entre os grupos significativos na MANOVA das deformações relativas. A forma média do grupo 1 (Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira) está representada pela linha azul cheia que liga os marcos anatômicos de 1 a 10 e a forma média do grupo 2 (Muriaé, Rio Pomba e Viçosa), pela linha vermelha tracejada. As diferenças entre os dois grupos foram ampliadas em 10 vezes para facilitar a visualização.



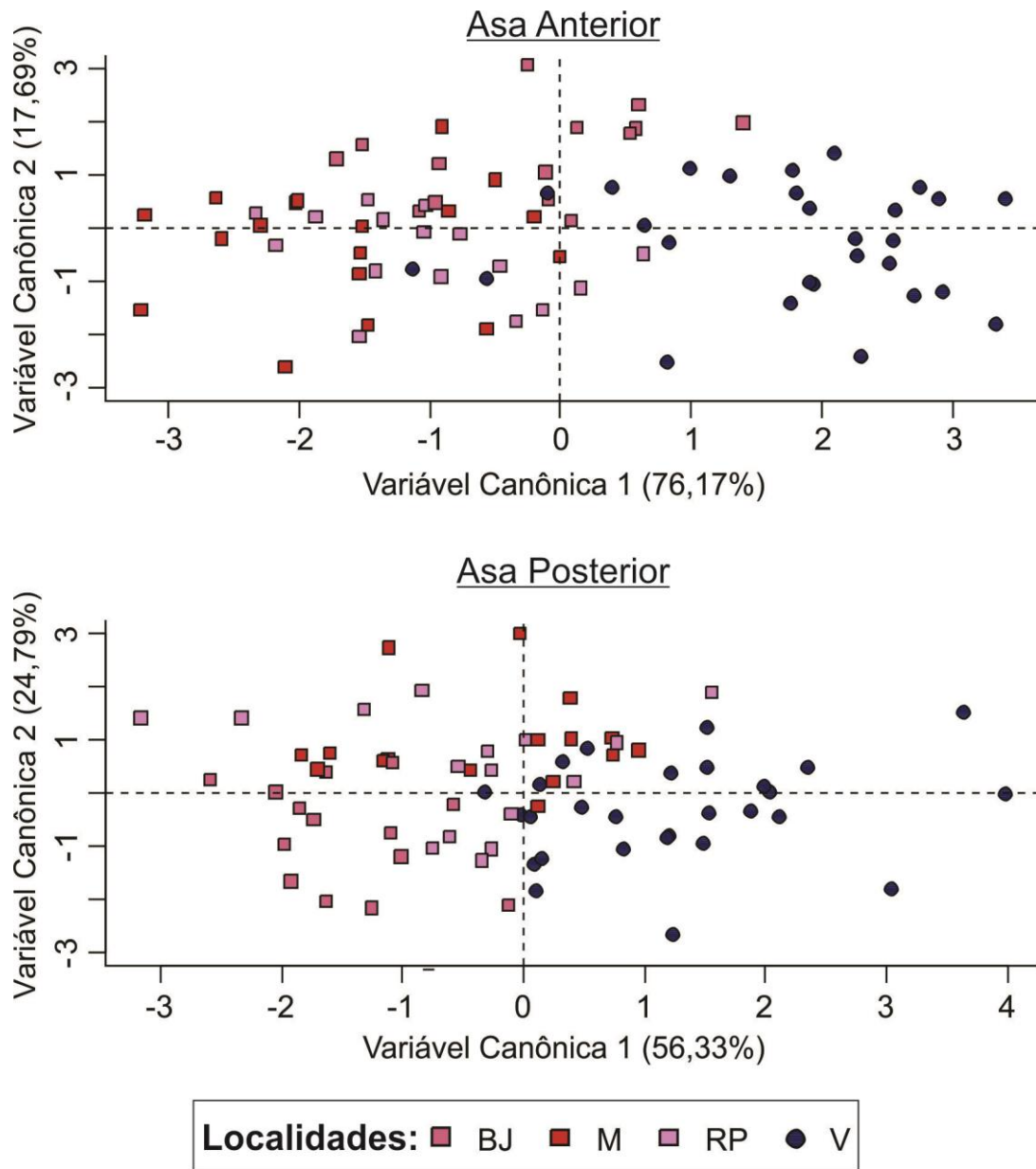
**Figura 1. 11.** Representação esquemática dos dois grupos de forma dados pela MANOVA em *Orthemis discolor* para ambas as asas. As localidades pertencentes ao mesmo grupo de forma estão ligadas por linhas tracejadas de mesma cor. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. A Serra do Brigadeiro (SB) está representada pela barra em verde; em que o tom mais escuro corresponde às porções de maior altitude e as mais claras, de menor altitude.

As distâncias de Procrustes entre os pares de localidade confirmam o isolamento dos indivíduos de Viçosa em relação aos das demais localidades em *O. discolor* (tabela 1.4), como também ocorre na análise gráfica das duas primeiras variáveis canônicas (figura 1.12). Este agrupamento, que também representa o padrão dado pelo tamanho do centroide das asas anteriores e posteriores, foi significativo na análise discriminante para as duas asas ( $p < 0,0001$ ), sendo que 78,95% dos indivíduos foram corretamente classificados em seus grupos pelos escores de validação cruzada na asa anterior e 68% na asa posterior (figura 1.13).

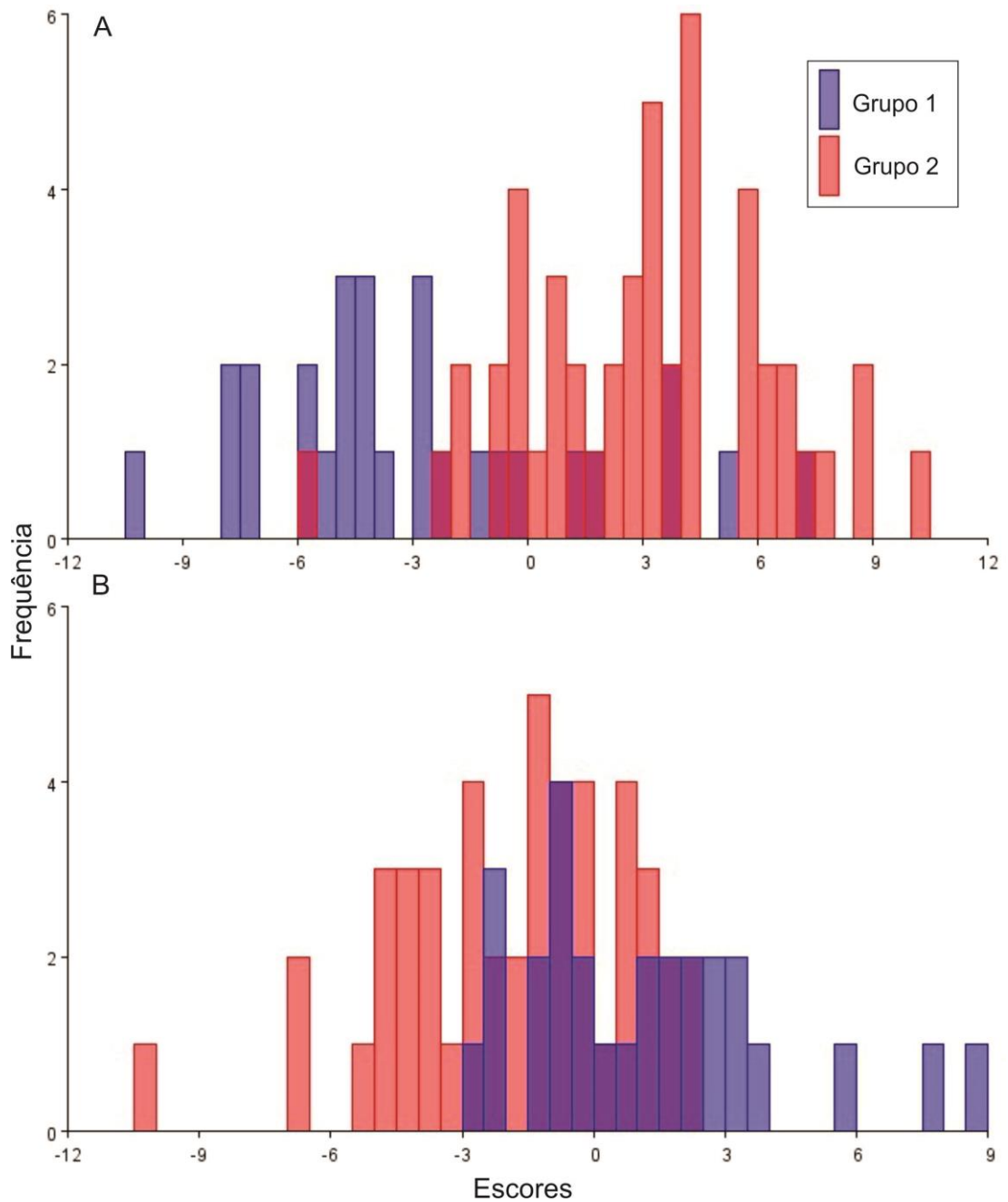
**Tabela 1. 4.** Distância de Procrustes entre as localidades de coleta em *Orthemis discolor*. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias para a asa anterior e os valores acima, para a posterior. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Distâncias significativas ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*”.

	BJ	M	RP	V
BJ	-	0,0080*	0,0065	0,0107*
M	0,0057	-	0,0061	0,0123*
RP	0,0066	0,0050	-	0,0098*
V	0,0072*	0,0078*	0,0085*	-

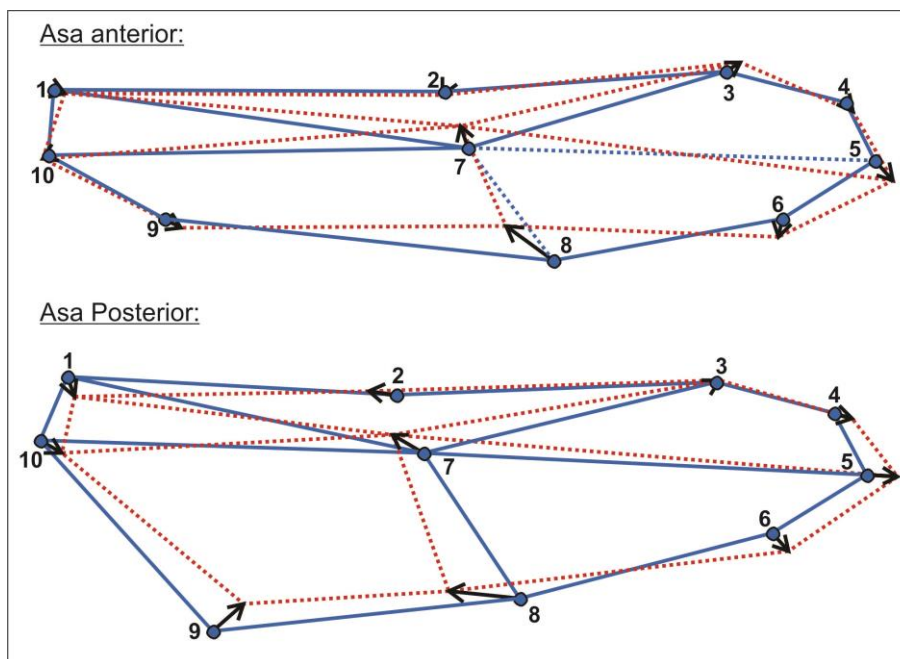
As asas anteriores do grupo formado por indivíduos de Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba são mais estreitas do que os de Viçosa, principalmente na região mediana, sendo o marco anatômico 8 o ponto com maior variação entre os dois grupos (figura 1.14). As asas posteriores seguem o mesmo padrão geral das asas anteriores, em que o marco anatômico 8 é o mais variável entre os grupos e as asas dos indivíduos de Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba são mais estreitas (figura 1.14).



**Figura 1. 12.** Análise gráfica da primeira e segunda variáveis canônicas em *Orthemis discolor* para a asa anterior e asa posterior, com a porcentagem de explicação de cada variável entre parênteses. Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Os grupos de forma identificados pela MANOVA das deformações relativas e distância de Procrustes estão representados por pontos do mesmo tipo: grupo 1 (Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba) – quadrados em tons de vermelho; grupo 2 (Viçosa) – círculo azul.



**Figura 1. 13.** Histograma dos escores de validação cruzada obtidos na análise discriminante em *Orthemis discolor*. O grupo 1 é formado pela localidade de Viçosa e o grupo 2 por Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba, conforme indicado pela MANOVA das deformações relativas e distâncias de Procrustes.



**Figura 1. 14.** Diferenças de forma das asas em *Orthemis discolor* entre os grupos significativos na MANOVA das deformações relativas. A forma média do grupo 1 (Viçosa) está representada pela linha azul cheia que liga os marcos anatômicos de 1 a 10 e a forma média do grupo 2 (Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba), pela linha vermelha tracejada. As diferenças entre os dois grupos foram ampliadas em 10 vezes para facilitar a visualização.

## Discussão

A morfometria geométrica das asas identificou padrões diferentes de estrutura geográfica em *E. fusca* e *O. discolor*. Em *E. fusca*, os indivíduos formaram dois grupos de tamanho, em que os indivíduos de Viçosa formaram um grupo, com as asas anteriores e posteriores menores, e as demais localidades, com asas maiores, formaram o outro grupo. Já em *O. discolor*, a variação no tamanho do centroide agrupou de forma diferente as localidades entre as asas anteriores e posteriores. Embora as diferenças de média sejam significativas entre grupos de localidade nas duas espécies, é nítida a sobreposição da variação observada entre as localidades (figuras 1.5 e 1.6) e, portanto, o agrupamento indicado pode não

refletir uma similaridade real de tamanho entre as localidades com médias estatisticamente iguais.

Quanto à diferença de forma, o agrupamento das localidades de *E. fusca* pode ser relacionado às diferentes altitudes das localidades de coleta: um grupo com as localidades de maior altitude, Alto Caparaó e Bom Jesus do Madeira, e o outro com as de menor altitude, Muriaé, Rio Pomba e Viçosa (figura 1.7). A variação na forma e tamanho das asas em ambientes dentro de um gradiente de altitude já foi identificada em diversas espécies de insetos, como mariposas (Hernández-L *et al.* 2010) e drosófilas (Pitchers *et al.* 2013). Variações morfológicas nas asas em função da altitude podem estar relacionadas às pressões aerodinâmicas para sustentação do voo em menores temperaturas e pressão atmosférica (Hernández-L *et al.* 2010). Por exemplo, em *Drosophila melanogaster*, o aumento na performance de voo em baixas temperaturas foi observado em indivíduos com maior área e comprimento de asas (Frazier *et al.* 2008). Apesar da relação entre a variação morfológica e altitude parecer direta, ela deve ser tomada com precaução, pois as diferenças de altitude incluem outros fatores. Ambientes com maior altitude, por exemplo, estão diretamente relacionados à maior incidência solar e menores temperatura, pressão atmosférica e disponibilidade de oxigênio, que podem isoladamente ou em diversas combinações afetar a morfologia dos indivíduos.

Por outro lado, os grupos morfológicos de *O. discolor* não estão divididos em função da altitude: o primeiro grupo inclui localidades com altas e baixas altitudes, Bom Jesus do Madeira, Muriaé e Rio Pomba, e o segundo, Viçosa, que apresenta altitude intermediária (figura 1.11), sendo esta separação observada na forma e tamanho dos indivíduos. Viçosa é a única localidade entre as amostradas em que as duas espécies deste estudo foram coletadas em lagoas diferentes conforme já descrito na seção de materiais e métodos. A lagoa em que *O. discolor* foi coletada

está situada na borda de mata, o que significa que este corpo d'água apresenta grandes áreas sombreadas e, conseqüentemente, menor variação da temperatura ao longo do dia. Já as outras localidades de coleta recebem diretamente a incidência solar e suas variações ao longo do dia. As libélulas possuem um ciclo de vida complexo, em que o estágio larval ocorre no ambiente aquático e o estágio adulto, no terrestre. Deste modo, as diferenças morfológicas (tamanho e forma) observadas podem refletir a variação ambiental em ambos os estágios. Uma possível explicação das diferenças morfológicas encontradas entre os indivíduos de *O. discolor* coletados em Viçosa dos coletados nas demais localidades é a relação entre as características do corpo d'água e o desenvolvimento larval. Um exemplo é a concentração de oxigênio dissolvido na água. Libélulas criadas em laboratório em condições com excesso de oxigênio dissolvido apresentaram tamanho 15% maior do que o normal (Vandenbrooks 2010). Também, a variação morfológica pode ser relacionada à temperatura da água durante o desenvolvimento larval. Em um experimento com *Drosófilas* desenvolvidas em diferentes temperaturas, Frazier *et al.* (2008) observaram que os indivíduos que se desenvolveram em temperaturas mais baixas (18 °C) apresentaram asas mais longas e com maior área. Assim, o maior tamanho do centroide observado e as variações de forma nos indivíduos de *O. discolor* em Viçosa podem ser explicados por uma menor temperatura do corpo d'água quando comparado aos demais amostrados. Entretanto, esta evidências devem ser confirmadas em experimentos com temperatura controlada durante o desenvolvimento larval, bem como para outras características físicas e químicas dos corpos d'água.

A morfometria tradicional e a geométrica das asas de Odonata têm sido mais frequentemente utilizadas no diagnóstico de espécies próximas (por exemplo, Demayo *et al.* 2011; Gyulavári *et al.* 2011) e na detecção de assimetria flutuante como indicadora de estresse ambiental (como em Floate & Fox 2000). A

caracterização de populações de uma mesma espécie com base na variação morfológica das asas ainda é pouco utilizada em Odonata e a morfometria geométrica é uma ferramenta ainda menos explorada. Por exemplo, quatro grupos de forma de asa foram reconhecidos em 10 populações de *Calopteryx splendens* (Sadeghi *et al.* 2009). Em *Coenagrion puella*, as populações distribuídas na margem da área de coleta apresentaram diferenças de forma significativas quando comparadas às localizadas na região central (Hassall *et al.* 2007). Porém, em ambos os exemplos, estas diferenças morfológicas intraespecíficas não foram extensivamente exploradas. Já em *Calopteryx virgo*, os autores avaliaram pares de competidores territoriais, mas nenhuma diferença morfológica foi observada entre os vencedores e os perdedores da disputa (Bots *et al.* 2012).

Os padrões de agrupamento das duas espécies, embora diferentes entre si, sugerem que a Serra do Brigadeiro restringe a dispersão em sua porção mais alta (entre Bom Jesus do Madeira e Viçosa), sendo uma barreira mais efetiva do que a distância geográfica nesta escala de estudo. Viçosa e Bom Jesus apresentam diferenças morfológicas significativas em ambas espécies, mas estão separadas pela menor distância entre localidades (46,0 km, figura 1.2). Em *E. fusca*, a ausência de diferença morfológica entre as localidades de Viçosa e Muriaé, em lados opostos da barreira, pode ser explicada pela conexão com a localidade de Rio Pomba (figura 1.7). Já em *O. discolor*, a localidade de Muriaé atuaria como um conector entre Bom Jesus do Madeira e Rio Pomba (figura 1.11), também em lados opostos da barreira, sugerindo que a Serra do Brigadeiro restringe a dispersão das espécies apenas em sua porção mais alta.

Este trabalho traz dois exemplos em Odonata sobre a utilização das ferramentas de morfometria geométrica no estudo de estruturação geográfica de populações. Dentro da literatura consultada, este é o primeiro trabalho no nível populacional com espécies da subordem Anisoptera. Destaca-se ainda a

necessidade de estudos populacionais com maior abrangência geográfica para melhor aproveitamento desta ferramenta, bem como experimentos focados diretamente na investigação da variação da forma das asas em função de uma variável ambiental.

## CAPÍTULO 2 – CÓPIAS NUCLEARES DE GENES MITOCONDRIAIS (*NUMTS*) EM ODONATA

## First Record Of Nuclear Mitochondrial DNA (numts) In Odonata

Camila de Sousa Queiroz<sup>1,3</sup>, Lucio Antonio de Oliveira Campos<sup>2,4</sup>, Karla Suemy  
Clemente Yotoko<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioinformática e Evolução, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. Av, P.H. Rolfs s/n Campus Universitário, Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brazil. Phone: +55 31 38993363. Fax number: +55 31 38992579.

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. Av, P.H. Rolfs s/n Campus Universitário, Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brazil. Phone: +55 31 38991299. Fax number: +55 31 38992579.

<sup>3</sup>Email: camila.queiroz@gmail.com.

<sup>4</sup>Email: lcampos@ufv.br.

<sup>5</sup>Email: karla@ufv.br. Corresponding author.

Artigo submetido para publicação na revista *International Journal of Odonatology* e em fase de revisão.

## **Abstract**

Mitochondrial DNA markers are commonly used for species identification and population studies. In this work, we attempted to compare populations of two libellulid species (Odonata) with distinct flight behavior using the mtDNA gene NADH dehydrogenase subunit 1. During sequence analysis, however, we found some evidence for pseudogenes and chromatograms with double peaks, suggesting the presence of nuclear-located copies of this gene, known as numts. The presence of numts is often neglected in the literature and may adversely affect the conclusions of this type of study due to poor positioning of specimens in certain genetic groups. This article relates the first record of numts in Odonata species.

**Keywords:** Dragonfly; *Erythrodiplax fusca*; NADH dehydrogenase subunit 1 gene; NADH dehydrogenase subunit 1 like; ND1; ND1-Like; mitochondrial pseudogene.

## Introduction

Phylogeographic studies of closely related animal species are commonly based in mitochondrial DNA sequences (Moraes *et al.* 2009; Resende *et al.* 2010; Aoki *et al.* 2013). This is due mainly to the simple interpretation of uniparental inheritance (maternally exclusive) and extensive intraspecific polymorphism (Avice *et al.* 1987), allowing the quantification of genetic variability within and between populations. This information is essential for identifying threatened populations and species, because reduced genetic variability is a risk factor. Moreover, phylogeographic studies are useful in conservation biology, providing details of biogeographic aspects of species or species groups (Hypša *et al.* 2002; Aoki *et al.* 2013).

mtDNA sequences are used as an auxiliary tool in species taxonomy (Bridge *et al.* 2005; Pons *et al.* 2006) and within-species genetic group delimitation (Moraes *et al.* 2009). These applications are commonly known as DNA barcoding (Hebert *et al.* 2003) as they compare mtDNA gene (commonly the subunit 1 of cytochrome c oxidase – COI) of a specimen with those available in public databases. When the divergence between these two sequences is less than 3%, we consider the specimens as belonging to the same species (Hebert *et al.* 2003). This approach requires the extraction, amplification and sequencing of a short mtDNA fragment (about 500 base pairs – bp) from the DNA of the tissue.

Phylogenetic and phylogeographic methods presume that the sequences compared are orthologous copies of a gene. Although this has been taken for granted in mtDNA animal studies, this assumption has been challenged when mitochondrial genes were detected in the nuclear genome (numts) (Fukuda *et al.* 1985; Lopez *et al.* 1994). These fragments are copies of mitochondrial genes that have migrated to the nucleus at some point in the evolutionary history (Berthier *et al.*

2011; Cristiano *et al.* 2012). Indeed, numts have been identified in many animal groups (Richly & Leister 2004), including several insect orders (Hlaing *et al.* 2009; Koutroumpa *et al.* 2009; Berthier *et al.* 2011; Cristiano *et al.* 2012). However, the consequences of the presence of numts for phylogenetic and phylogeographic analysis remains neglected (Zhang & Hewitt 1996; Hlaing *et al.* 2009; Bertheau *et al.* 2011; Cristiano *et al.* 2012). Once such copies are inserted into the nuclear genome, they lose their functional role and show a lower mutation rate than their mitochondrial counterparts due to the repair mechanisms in the nucleus. Thus, comparing data with distinct evolutionary histories may mislead the conclusions about the relatedness of species and populations.

In this work, we initially intended to compare the genetic population structuring pattern of two libellulid species with distinct flight behavior, *Erythrodyplax fusca* (Rambur, 1842) and *Orthemis discolor* (Burmeister, 1839), using the mitochondrial gene NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1). However, our results suggested that we had sequenced numts instead of real mtDNA copies in some individuals of *E. fusca*. Therefore, this paper shows the evidence for numts in this libellulid species and aims to raise awareness of this problem in the odonate order.

## **Materials and Methods**

We obtained ND1 sequences from 30 individuals of *E. fusca* sampled in five different locations in Minas Gerais State, Brazil. We collected the specimens with an insect net and stored them in commercial alcohol at -20 °C. The total DNA of each specimen was extracted according to Fernandes-Salomão *et al.* (2005), with slight adjustments.

We chose the ND1 gene based on previous analysis of available sequences at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), which showed a high level of

genetic variability in odonate species (Rach *et al.* 2008). The studied fragments were generally short (500 bp or less) when compared to the whole gene size. So, we designed our own pair of primers, starting from the complete mitochondrial genomes of two Odonata species, *Euphaea formosa* Hagen in Selys, 1869 (NC\_014493) and *Davidius lunatus* (Bartenev, 1914) (NC\_012644) and from the partial mitochondrial genome of *Orthetrum triangulare* (Selys, 1878; AB126005). The primers ND1\_Od\_F (5' AATTGGAGCACGNCCAGTTG 3') and ND1\_Od\_R (5' TCTGAGTTCAGACCGGTTTAA 3') were used to amplify the entire ND1 gene. The amplification reactions were set up with Taq Platinum Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. These reactions were initially put in 13 touchdown cycles, where the annealing temperature decreased 1 °C per cycle (from 60 to 47 °C) and were then kept at 47 °C for annealing for additional 25 cycles. MacroGen Inc (Seoul, South Korea) sequenced the amplified fragments with the ND1\_Od\_F primer.

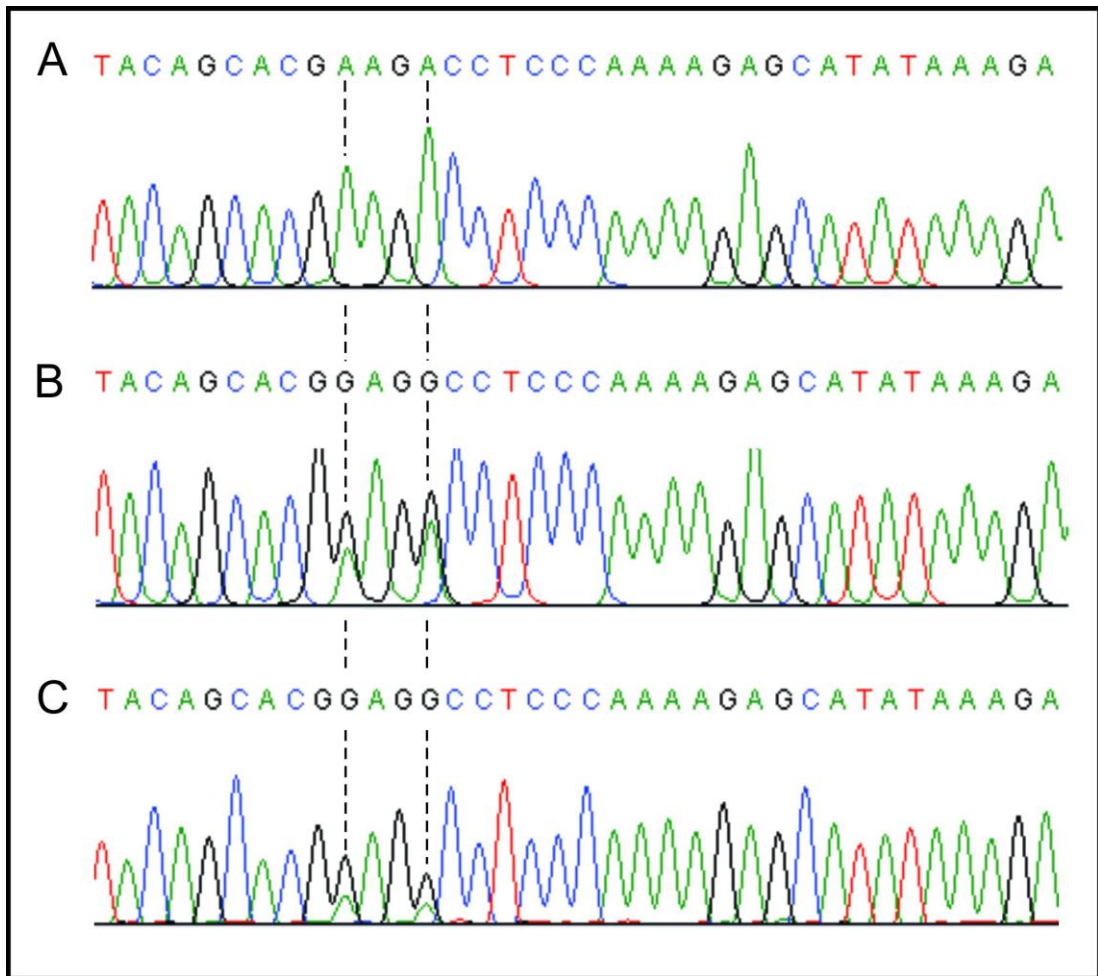
We analyzed and edited the chromatograms using the software Phred, Phrap and Consed (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.* 1998; Gordon *et al.* 1998). The sites with double peaks in the chromatograms were assigned as a corresponding ambivalence code for later identification. The nucleotide sequences were translated to their putative amino acid sequences, aligned with MUSCLE (Edgar 2004) implemented in MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011), then returned to nucleotide sequences for further analyses. We used the ND1 sequences from the complete mitochondrial genomes of *E. formosa* and *D. lunatus* as a reference of the amino acid sequence of this protein. We determined the putative numts following the flowchart proposed in Cristiano *et al.* (2012).

## Results

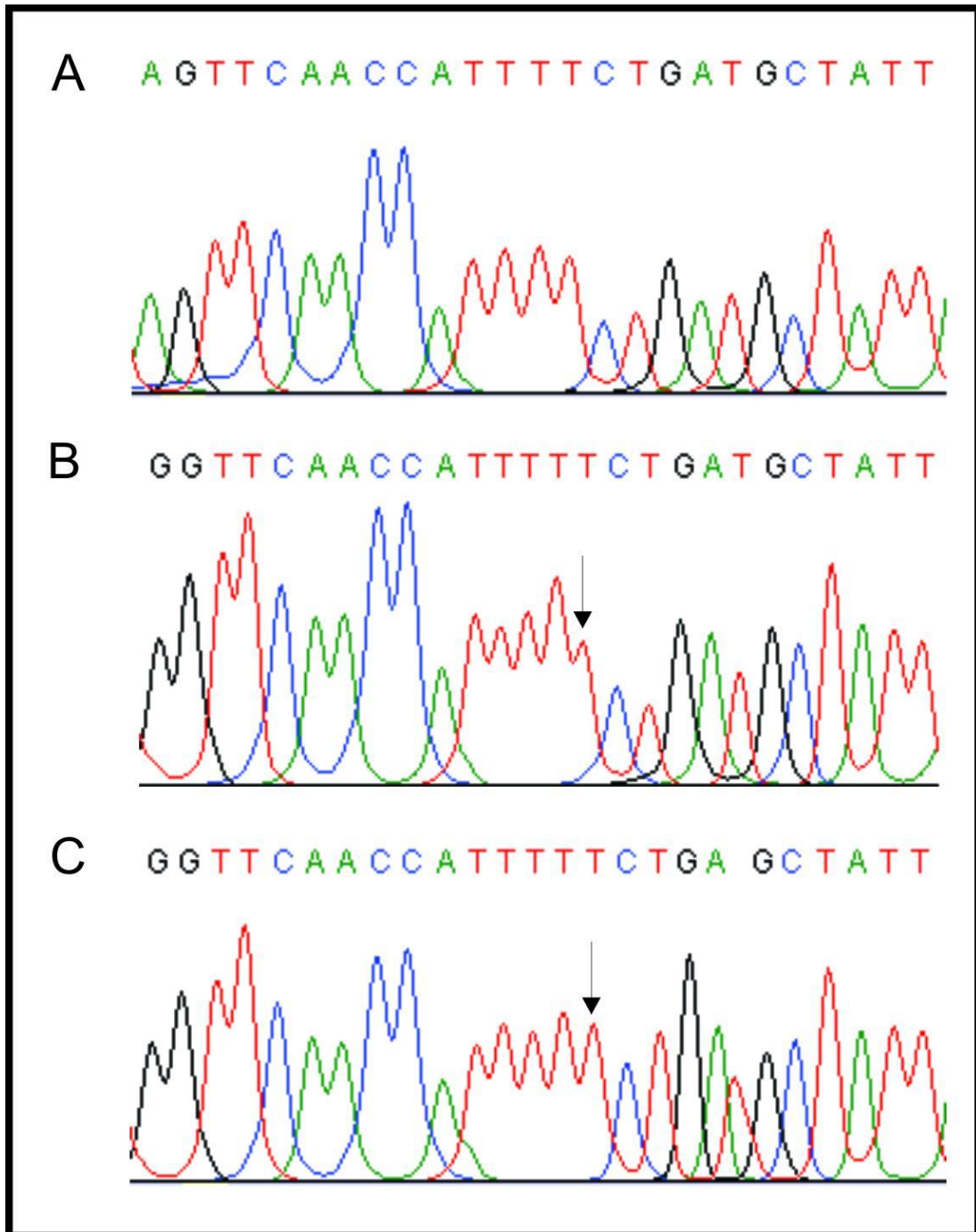
We aligned the 30 sequences of the ND1 gene from *E. fusca* (GenBank accession numbers in progress) with the two model sequences from *E. formosa* and *D. lunatus*. The complete ND1 gene has 951 bp that were translated into a 317 amino acid sequence. Our sequences have between 721 and 951 bp. This size difference between our sequences is due to a variation in sequencing coverage.

We found evidence for the presence of numts in eight of the 30 sequenced *E. fusca*. Four of them exhibit double peaks in the chromatograms (e.g. Figure 2.1), indicating the existence of more than one sequence among the amplified fragments. In the other four putative numts sequences, two have an insertion of one nucleotide and two have a deletion of one nucleotide (Figure 2.2). For coding genes, indels of one or two bp produce frameshift mutations that modify the sequence of amino acids incorporated ahead of the indel position, suggesting they are pseudogenic copies.

A GenBank search among ND1 sequences of libellulid species revealed evidence of double peak in *Brachythemis contaminata* (Fabricius, 1793) (KC197040), which contains one nucleotide assigned as "R" (adenine or guanine). The remaining GenBank sequences seem to be true mitochondrial sequences based on the putative amino acid sequence. However, this conclusion should be taken with caution, because these sequences are too short (less than 500 bp usually) and partially comprise ND1, which could mask the evidence of numts.



**Figure 2. 1.** Partial chromatograms showing the same region of three sequences produced from PCR fragments obtained using primers designed to amplify the NADH dehydrogenase subunit 1 mitochondrial gene in *Erythrodyplax fusca*. (A) Example of a chromatogram showing a putative mtDNA sequence. Chromatograms showing the forward (B) and reverse (C) sequences of the same individual, with double peaks (Highlighted with dashed lines). The letter above each peak indicates the corresponding nucleotide (A - adenine, C - cytosine, G - guanine, T - thymine and R - purine).



**Figure 2. 2.** Partial chromatograms showing the same region of three sequences produced from PCR fragments obtained using primers designed to amplify the NADH dehydrogenase subunit 1 mitochondrial gene in *Erythrodryplax fusca*. (A) Example of a chromatogram showing a putative mtDNA sequence. (B and C) Chromatograms showing two different individuals with T insertions at the same position (indicated by an arrow), producing an anomalous amino acid sequence. The letter above each peak indicates the corresponding nucleotide (A - adenine, C - cytosine, G - guanine, T - thymine).

## Discussion

The evidence indicating the presence of numts may be subtle, but their existence must be noted to avoid problems with data interpretation. Some researchers ignore the step of translating the codifying sequences to the expected amino acid sequences (each nucleotide triplet means one amino acid in the genetic code) when analyzing the alignment. This is a very simple step and may be done with the aid of software such as MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

Another interesting procedure is the comparison of the aligned sequences with one available from a complete mitochondrial genome of a related group. If the translated amino acids match each other or are very similar (they must code the same proteins in both organisms), it is likely that the sequence under investigation is truly mitochondrial sequence. On the other hand, when we have strong evidence of an anomalous amino acid substitution (Milá *et al.* 2011) or the *in silico* translation results in premature stop codons, we can assume the presence of numt and it should be removed of the phylogenetic or phylogeographic analysis (Cristiano *et al.* 2012).

Double peaks, the other pattern found in the present work and interpreted as evidence of numts, are not at first concrete evidence of them. However, when they appear in clear chromatograms (Figure 2.1), they suggest that at least two distinct fragments were amplified and sequenced, which was not to be expected since each individual must have the same mtDNA (multiple copies of mitochondrial genome in each mitochondria) in all cells (Awise *et al.* 1987). Heteroplasmy (mtDNA from the egg and spermatozoid that formed the organism) is one known exception to this rule, but this phenomenon appears to be much more unusual than the occurrence of numts (Magnacca & Brown 2010).

Many errors may result when the possibility of the numt is not taken in account. Numts can migrate to the cellular nucleus anytime during the evolutionary process. If the migration occurred recently, after the last speciation event, the most likely outcome is that it will not affect phylogenetic analysis (Berthier *et al.* 2011). It is also likely that such numts will not be detectable by deletions, insertions or substitutions that result in premature stop codons. In this case, however, even if they are not detectable, the numts amplification may deeply affect the phylogeographic analysis.

If the migration to the nucleus occurred earlier, prior to the divergence between two or more closely related species, the sequencing of the numts instead of mtDNA in all species may led to the conclusion that there is no molecular differentiation between them (these sequences stay more conserved in the nucleus). Even more serious, and harder to detect, is the possibility of sequencing the numt in some specimens and the mtDNA in others. In these cases, numts from different species may be grouped in phylogenetic analysis, while the sequences of mtDNA are grouped in a different manner, more compatible with the phylogenetic relationships between the specimens. Depending on which sequence was obtained from each specimen, this pattern may result in false species groupings, moreover causing false indications of hybridization between species (mitochondrial introgression), one of the most common interpretations when two close species share a mitochondrial haplotype (e.g. Moraes *et al.* 2009). This type of interpretation may even result in incorrect policies to try to avoid the propagation of hybrids.

This work revealed the presence of numts in a species of Odonata, a group where until now this phenomenon had not been documented. As most researchers simply discard this type of finding, it is quite possible that many more groups of organisms present the same problem. In our laboratory, this is the third group in which we have had the opportunity to encounter this type of sequence. The numts

ended up eliminating the chances to construct a phylogeographic hypothesis for *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera), a species of Brazilian bee seriously threatened with extinction (Cristiano *et al.* 2012). In addition, the numts greatly reduce the sampling specimens of the subfamily Listroscolidinae Redtenbacher, 1891 (Orthoptera) (unpublished data) to be included in a phylogeographic work involving species endemic to the Atlantic Forest Central Corridor.

We would like to suggest to researchers interested in using mtDNA in their studies within Odonata to check their sequences for the possibility of being numts before using them, to the extent possible, using relatively long sequences in their analyses, because the shorter sequences (approximately 500 pb) reduce the probability of detecting this type of problem. It is also convenient, when possible, to include sequences from different individuals of each species in the phylogenetic tree, which may increase the possibilities of detecting numts through inconsistencies, as the appearance of the same species in distinct phylogenetic groups.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPQ) for financial support of this project. They also thank Amanda Meira, Fábio Felipe, Jansen Vargas, Verônica Fialho and Waldor Andrade for help in collecting samples.

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE  
*ERYTHRODIPLAX FUSCA* E *ORTHEMIS DISCOLOR* COM  
MARCADORES DE DNA NUCLEAR

## Introdução

A dispersão é uma característica do ciclo de vida de uma espécie que influencia numerosas atividades como a defesa do território, reprodução, forrageamento etc, com efeitos dinâmicos e genéticos para a espécie (Prugnolle & de Meeus 2002). Indiretamente, a diferença de capacidade dispersiva entre duas espécies pode ser inferida através do fluxo gênico entre populações e, portanto, através de ferramentas de análise de estruturação populacional.

Odonata é uma das ordens de insetos alados com grande potencial para estudos de dispersão devido aos diferentes padrões de comportamento de voo. Os Odonata são subdivididos em função do comportamento de voo em pousadores (“perchers”) e voadores (“fliers”). Tipicamente, espécies denominadas voadoras permanecem em voo durante as atividades de forrageio ou reprodução, enquanto as denominadas pousadoras passam a maior parte do tempo pousadas em poleiros ao redor dos sítios de reprodução e forrageamento, de onde saem para realizar voos curtos (Corbet 1983). Contudo, são poucos os trabalhos que utilizam Odonata como modelo de estudo para comportamentos de dispersão (Conrad *et al.* 1999) e uma parte ainda menor destes são baseados em estruturação populacional com marcadores genéticos, como em Keller *et al.* (2010) e Damm & Hadrys (2012), prevalecendo os estudos de marcação e recaptura (por exemplo, Palacino-Rodríguez *et al.* 2012; Altamiranda-S & Ortega-M 2012).

*Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor* (Libellulidae, Anisoptera, Odonata) são consideradas espécies pousadoras, porém, quando observadas em campo, apresentam diferenças marcantes quanto à distância que percorrem durante estes voos curtos. *E. fusca* é uma espécie que passa muito mais tempo pousada e percorre trechos menores durante o voo. Já os machos de *O. discolor* defendem amplos territórios (Marco Jr & Resende 2004) e percorrem trechos longos durante o

voo, sendo inclusive perdidos de vista no sítio reprodutivo. A divisão em pousadoras e voadoras leva em consideração apenas o fato de que as espécies denominadas voadoras nunca são vistas pousadas e não há discriminação quanto à habilidade de dispersão das pousadoras, que parece muito variável.

O objetivo deste capítulo foi comparar a capacidade dispersiva entre duas espécies pousadoras, *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*, através de marcadores moleculares neutros. Além disso, a variação genética em regiões nucleares de DNA foram correlacionadas à distância geográfica entre as localidades de coleta e à presença de uma barreira de altitude.

## **Material e Métodos**

### *Extração do DNA*

As localidades e procedimentos de coleta foram os mesmos adotados e descritos no capítulo 1.

A primeira tentativa de extração do DNA foi baseada na maceração do músculo torácico (apêndice A – Extração de DNA de Odonata – protocolo padrão LBE), procedimento comum para outros Odonata (por exemplo, Jordan *et al.* 2003; Dumont *et al.* 2005; Koizumi *et al.* 2011). Contudo, a extração de DNA por este protocolo resultou em uma solução com bastante DNA degradado, fato evidenciado pelo arraste observado abaixo da banda principal em gel de agarose, e excesso de RNA. O primeiro ajuste feito no protocolo foi a diminuição da quantidade de músculo torácico utilizada por indivíduo em cada extração. Deste modo, é necessário menos esforço durante a maceração, o que diminui as possibilidades de degradação, e a relação entre o volume de tampão de extração utilizado e a quantidade de tecido é aumentada, aumentando a eficiência da extração. Também

foi adicionada uma etapa de tratamento com RNase entre o passo final de desproteinização (Passo 9 - Apêndice A - Extração de DNA de Odonata - Protocolo Padrão LBE) e a precipitação do DNA com isopropanol (Passo 10). Porém, nenhuma destas modificações melhorou a quantidade e qualidade da solução final de DNA.

A segunda bateria de testes foi realizada com kit de extração "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega), ainda com músculo torácico. Inicialmente, foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante para tecido animal com cerca de 8,0 mg de músculo torácico. Ainda assim, a degradação do DNA permanecia bastante evidente em gel de agarose. Buscando contornar a degradação, a primeira modificação no protocolo de extração com kit consistiu na preparação do material. O músculo torácico foi seco em papel toalha para remover o excesso de álcool do armazenamento e congelado em nitrogênio líquido dentro de microtubos de 1,5 ml, só então o músculo congelado foi macerado. Adicionalmente, todas as etapas posteriores foram realizadas no gelo. Como a degradação do DNA persistiu, uma hipótese é a presença de grande quantidade de endonucleases nestas espécies. Estas enzimas em contato com o DNA na etapa de tratamento com RNase, a 37 °C (temperatura de atividade das endonucleases em geral) poderiam causar a degradação observada. Por isso, antes do tratamento com RNase, foi adicionado um passo de tratamento com protease (proteinase K) por 4 horas, de forma a degradar as endonucleases antes da incubação a 37 °C. As medidas adotadas diminuíram a quantidade de degradação observada, mas a quantidade de DNA obtida por extração foi baixa.

A terceira etapa de testes para a extração do DNA foi a introdução das modificações que deram resultados com o kit no protocolo utilizado anteriormente, incluindo a maceração em nitrogênio líquido, a incubação por 4 horas com proteinase K e o tratamento com RNase. Além disso, outros tecidos foram testados.

A utilização das pernas, procedimento também já reportado em Odonata (Watts *et al.* 2006; Damm *et al.* 2010) e bem sucedido em outros grupos de insetos em nosso laboratório, não apresentou o rendimento adequado para ambas espécies do presente trabalho. Por outro lado, a extração de DNA a partir da cabeça resultou no aumento da quantidade final de DNA na solução, mas a degradação do RNA continuou pouco eficiente. Deste modo, um terceiro protocolo foi testado, o descrito por Fernandes-Salomão *et al.* (2005) e modificado pelo Prof. Helder Canto Resende, a partir do qual o DNA das amostras foi adequadamente extraído para as análises subsequentes.

Em *E. fusca*, metade da cabeça foi cortada com estilete e macerada em nitrogênio líquido para extração do DNA, enquanto em *O. discolor*, espécie de maior tamanho, apenas um quarto da cabeça foi utilizado. O tecido macerado foi incubado em banho-maria à 65 °C em tampão CTAB com protease. As proteínas foram retiradas da solução com fenol-clorofórmio e, posteriormente, apenas clorofórmio. Devido à grande quantidade de material, a etapa de tratamento com RNase foi modificada: a solução já desproteïnizada de DNA de cada indivíduo foi dividida em dois microtubos e a cada um deles foi adicionado solução de RNase 20mg/ml e incubado à 37°C. Em seguida, o DNA foi precipitado com isopropanol e NaCl 5 M a -20°C. O material foi submetido então a três ciclos de centrifugação e limpeza com etanol 70%. O material precipitado e limpo foi ressuspensionado em solução TE e armazenado a -20°C para uso subsequente.

#### *Escolha dos genes para análise*

Entre os marcadores moleculares, os loci de microssatélites são uma fonte importante de informação genética nos estudos populacionais (Goldstein & Schlotterer 1999; Webster & Reichart 2005). Apesar das reconhecidas vantagens

de dados obtidos com marcadores microssatélites, os trabalhos em Odonata ainda são escassos. Watts (2009) revisou os trabalhos com microssatélites em Odonata e reportou que são poucos loci isolados por espécie e que estes são relativamente curtos (menores que 10 repetições em média). As dificuldades de isolamento de regiões microssatélites em Odonata foram confirmadas neste trabalho e as etapas de desenvolvimento de “primers” para ambas espécies não pode ser completada. O protocolo utilizado para o isolamento dos loci microssatélites foi proposto por Glenn & Schable (2005), baseado no uso de bibliotecas genômicas enriquecidas com fragmentos de DNA repetitivo. Foram enviadas 84 colônias de *Escherichia coli* com insertos de *O. discolor* para o sequenciamento, mas apenas 17 deles resultaram em cromatogramas bons para análise. Destes 17, foram encontrados microssatélites apenas em cinco sequências. Não foi possível, no entanto, desenhar “primers” para nenhuma destas regiões, pois os cromatogramas não permitiram a leitura das sequências flanqueadoras das regiões de repetição. Diante deste resultado, mais um grupo de colônias foi sequenciado, mas nenhum cromatograma de qualidade foi obtido. Ainda, foi feita uma tentativa de sequenciar novamente os fragmentos com microssatélites, mas os cromatogramas continuaram com a mesma baixa qualidade. Em *E. fusca*, o sequenciamento de nenhuma das 87 colônias selecionadas foi positivo. Tendo em vista o resultado semelhante em *O. discolor*, com o fracasso de novas tentativas de sequenciamento, outras colônias com insertos de *E. fusca* não foram enviadas para sequenciar. Além disso, a tentativa de transferência de “primers” já desenhados para outros Libellulidae (Giere & Hadrys 2006; Hadrys *et al.* 2007) falhou.

A segunda opção para este trabalho foi a utilização de regiões de DNA mitocondrial. Estes marcadores também são bastante utilizados nos trabalhos de genética de populações em grupos animais, sendo caracterizados pela herança materna e não recombinante, pelas taxas mais elevadas de evolução do que as

regiões nucleares e pelo extenso polimorfismo intraespecífico (Avisé et al. 1987). No entanto, a amplificação e o sequenciamento da região da subunidade 1 da NADH desidrogenase revelaram a presença de cópias nucleares (“numts”) em *E. fusca*, conforme já discutido no capítulo 2. Para esta região, nenhuma sequência com qualidade suficiente para análise foi obtida em *O. discolor*. Pelo mesmo motivo, o sequenciamento de uma segunda região mitocondrial, da subunidade I da citocromo c oxidase, também não foi bem sucedida para ambas espécies.

Dada a escassez de trabalhos em espécies próximas de Libellulidae e de sequências disponíveis no GenBank para desenhos de “primers”, dois pares de “primers” para regiões nucleares foram adotados baseados nos resultados do estudo de Lee & Lin (2012) do gênero *Euphaea* pertencente à subordem Zygoptera (Odonata). No trabalho de Lee & Lin (2012), foram usados “primers EPIC” (“Exon-primed Intron Crossing primers”), que são “primers” desenvolvidos para sequenciamento de íntrons, mas ancorados nas regiões codificadoras, permitindo desta forma a aplicação em espécies mais distantes. Apesar do trabalho no gênero *Euphaea* focar na divergência entre espécies, duas regiões apresentaram variação intraespecífica compatível com as comumente usadas em trabalhos populacionais: um íntron para a região anônima (sequência codificadora de função desconhecida) e um íntron para o fator de alongamento 1 alfa (Lee & Lin 2012).

#### *Amplificação e sequenciamento*

A amplificação dos íntrons das regiões nucleares anônima (Anon) e fator de alongamento 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) foi conduzida sob as mesmas condições nas duas espécies deste trabalho. O íntron da região Anon compreende um fragmento de cerca de 500 pb e o da região EF1 $\alpha$ , 1200 pb. Cada reação de amplificação, realizada com kit Taq Platinum (Invitrogen), continha tampão 1X, 0,2  $\mu$ M de cada

“primer” (tabela 3.1), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e aproximadamente 20 ng de DNA. As reações foram conduzidas em termociclador PCR Life Pro (Bioer), com uma etapa de 13 ciclos “touch down” para a temperatura de “annealing” de 60 a 47°C, seguida de 17 ciclos com temperatura de “annealing” fixa a 47°C. O sucesso das reações de amplificação foi verificado em gel de agarose 1,5% com corante GelRed (Biotium). Os fragmentos amplificados foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea) com apenas o “primer” direto. Posteriormente, o sequenciamento com “primer” reverso foi realizado para as sequências que ficaram curtas ou para aquelas em que foram identificadas inserções/deleções.

**Tabela 3. 1.** Sequência dos pares de “primers” usados para cada região nuclear

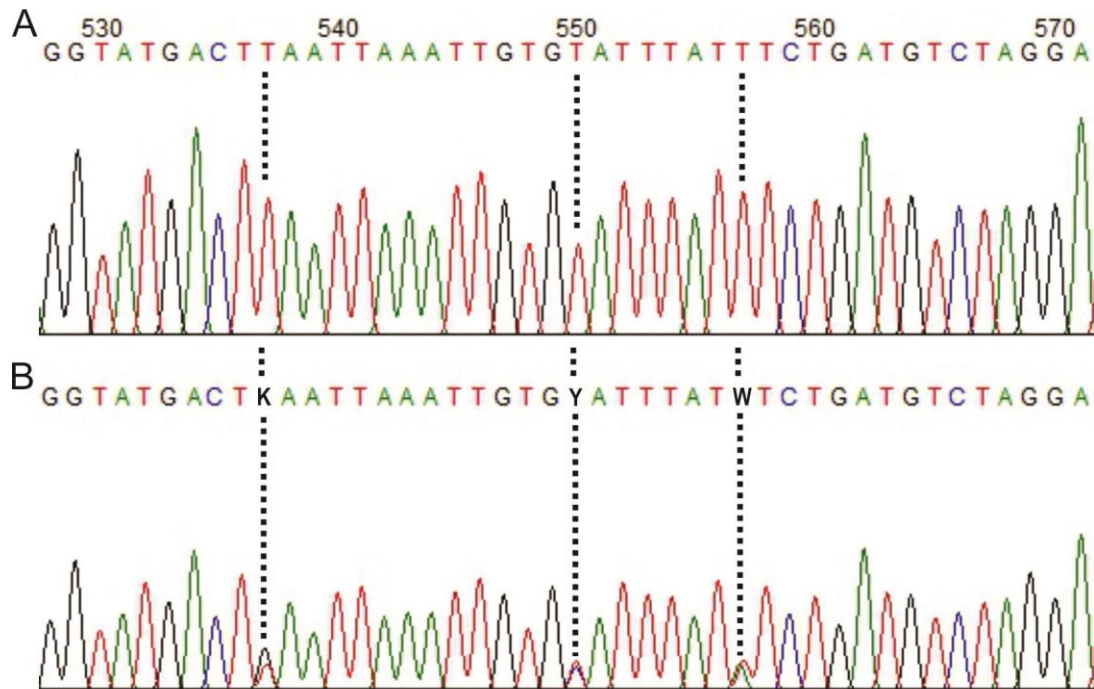
Região	“Primer”	Sequência (5’ – 3’)
Anon	Anon_F	CCAATCAACTTCACCCAACTGCT <sup>1</sup>
	Anon_R	GAAGTTGTCTCCCCAGGTCATAAG <sup>1</sup>
EF1α	EF1a_F	YGGMCACAGRGATTTTCATCAA <sup>1</sup>
	EF1a_R	CCAGGRTGGTTRAGCACRATGA <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2012)

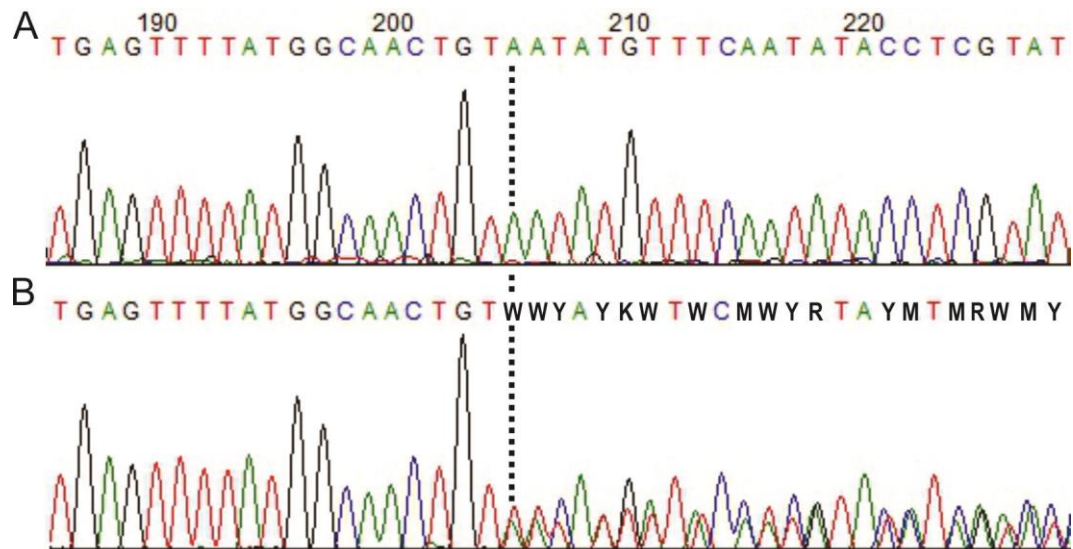
#### *Análise da variação genética*

Os cromatogramas foram analisados com o auxílio do conjunto de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.* 1998; Gordon *et al.* 1998). As duas regiões utilizadas são regiões nucleares, por isso, sujeitas a variações intraindividuais entre os alelos (indivíduos heterozigotos) ou entre diferentes cópias do mesmo gene. Na análise dos cromatogramas, esta variação foi identificada pela sobreposição de duas ou mais sequências, de duas formas distintas. A primeira pela presença de picos duplos em cromatogramas de ótima

qualidade (cromatogramas sem sinal residual ao longo das seqüências, figura 3.1). A segunda forma é a presença de inserções/deleções, que resulta em alelos com diferentes comprimentos e que podem ser identificados pela interrupção da seqüência clara de picos no cromatograma e início de duas seqüências sobrepostas (figura 3.2).



**Figura 3. 1.** Variação intraindividual na região EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca*. A – cromatograma com uma seqüência única; B – cromatograma exemplificando a sobreposição de no mínimo duas seqüências distintas, fato evidenciado pela presença de picos duplos. As linhas tracejadas destacam os sítios em que os picos duplos foram observados em B.



**Figura 3. 2.** Variação intraindividual na região Anon em *Orthemis discolor*. A – cromatograma com uma sequência única; B – cromatograma exemplificando a sobreposição de duas sequências do mesmo gene com tamanhos diferentes devido à ocorrência de uma inserção/deleção. A linha tracejada indica o sítio em que inicia a sobreposição das duas sequências. A partir deste ponto, é possível notar ainda que um dos picos do cromatograma em B corresponde à cópia presente em A.

A reconstrução das fases, isto é, a determinação das duas sequências de uma mesma região gênica presentes nos indivíduos em que a variação intraindividual foi observada foi feita através da inferência Bayesiana implementada no programa Phase 2.1.1 (Stephens *et al.* 2001) com as opções padrão. Os arquivos de entrada para esta análise foram montados na ferramenta online SEQPHASE (Flot 2010), bem como a conversão do arquivo de saída no formato FASTA. No caso dos indivíduos em que houve variação no tamanho de alelos, a fase foi determinada no programa Champuru v1.0 (Flot *et al.* 2006; Flot 2007).

As sequências foram alinhadas no MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Os índices de diversidade molecular foram calculados pelo programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Este mesmo programa também foi usado para a comparação par a par das localidades pelo índice  $F_{ST}$  e para a análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992). O teste de significância do  $F_{ST}$  entre os pares de localidades e dos índices de fixação e componentes de variância da

AMOVA foram determinados com 10.000 permutações. As análises foram conduzidas com a opção de fase conhecida apenas para os conjuntos de dados em que as probabilidades de fase foram superiores a 0,9.

## **Resultados e Discussão**

### *Esforço de sequenciamento e amostragem*

Conforme destacado na seção de Amostras e coleta (Material e métodos) do capítulo 1, o número de indivíduos coletados de *O. discolor* é cerca de metade do número de indivíduos de *E. fusca*, devido às dificuldades de captura. A tabela 3.2 indica o número de indivíduos coletados, de sequências solicitadas e de sequências que foram efetivamente aproveitadas nas análises, discriminadas por espécie, localidade e região gênica. Apesar do esforço empregado na obtenção de uma amostragem maior para as análises de estruturação populacional, poucas sequências de cada região puderam ser aproveitadas e alinhadas, principalmente em *E. fusca*.

Grande parte das reações de sequenciamento falharam, isto é, não produziram cromatogramas que puderam ser lidos claramente em uma sequência nucleotídica para ambos os “primers” de uma região. Em outros casos, apenas uma parte do cromatograma apresentou a qualidade adequada, resultando em uma sequência parcial curta da região de interesse. Estes problemas geralmente são relacionados à baixa concentração de DNA da amostra na reação, temperatura de “annealing” inadequada ou baixa especificidade de “annealing” entre os “primers” e amostra, como mostrado na própria página da empresa de sequenciamento (Macrogen Inc.) na seção de solução de problemas (<http://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/troubleshooting.jsp>). Dentre estas

alternativas, nenhuma oferece uma explicação determinante para as falhas observadas. Primeiro, o rendimento final das reações de amplificação foi semelhante entre as amostras e, também, o re-sequenciamento com quantidades iniciais maiores não apresentou a melhoria desejada, sugerindo que a baixa concentração da amostra não desempenhou um papel decisivo no sucesso do sequenciamento. A baixa especificidade dos “primers” também não parece uma explicação contundente para o caso, pois são “primers EPIC”, ancorados em regiões mais conservadas (éxons), e que funcionaram tanto em outros indivíduos das mesmas espécies em estudo quanto em espécies inclusive de subordens distintas de Odonata, indicando que os sítios de “annealing” são conservados. Este raciocínio pode ser aplicado também à temperatura de “annealing”, pois, neste caso, ela não deve variar substancialmente entre indivíduos de uma mesma espécie. Desse modo, consideradas todas as questões apontadas, o motivo da falha da maior parte das reações de sequenciamento é incerto e a investigação adicional requer investimento de recursos em etapas de clonagem e sequenciamento, que fogem do escopo deste trabalho.

A ocorrência de variação intraindividual no tamanho dos alelos foi outro fator essencial para a diminuição da amostragem. Mesmo sendo um evento facilmente identificado na análise dos cromatogramas e usando o programa adequado para a determinação das fases, poucas sequências puderam ser reconstruídas com auxílio do Champuru v1.0 (Flot *et al.* 2006; Flot 2007). Para a utilização correta desta ferramenta, a região onde há sobreposição de fragmentos (vide figura 3.2) deve ser identificada em cada sítio com os códigos de ambiguidade. No entanto, esta identificação fica mais difícil ao longo da sequência e não pode ser feita com precisão em trechos muito longos, o que prejudica o comprimento das sequências reconstruídas.

**Tabela 3. 2.** Comparação entre o número de indivíduos capturados (NC), sequências solicitadas (somadas as tentativas com os “primers” direto e reverso, NS) e o número de sequências efetivamente aproveitadas (NA) para as análises das regiões Anon e EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*.

Espécie	Localidade	NC	Anon		EF1 $\alpha$	
			NS	NA	NS	NA
<i>E. fusca</i>						
	Alto Caparaó	21	18	8	35	6
	Bom Jesus do Madeira	27	19	10	21	8
	Muriaé	50	21	11	23	8
	Rio Pomba	37	20	6	21	7
	Viçosa	20	20	8	22	8
	Total	175	98	43	122	37
<i>O. discolor</i>						
	Bom Jesus do Madeira	20	17	12	18	12
	Muriaé	19	18	10	14	13
	Rio Pomba	23	20	8	15	13
	Viçosa	24	19	13	13	13
	Total	86	74	43	60	51

### *Varição genética*

A variação intraindividual foi identificada em 100 % dos cromatogramas da região Anon e 80 % da EF1 $\alpha$  em *E. fusca*, enquanto em *O. discolor* isto ocorreu em 95,92% dos cromatogramas da região Anon e 92,16% da EF1 $\alpha$ . A separação das diferentes sequências observadas nos cromatogramas de um mesmo indivíduo não foi possível através da análise Bayesiana, pois as fases obtidas apresentaram baixas probabilidades posteriores (menor que 0,90) nas duas regiões nucleares em ambas espécies deste trabalho. A inferência estatística destas sequências foi prejudicada pelo alto número de polimorfismos intraindividuais e pelo baixo número de indivíduos com uma única sequência, pois o algoritmo aplicado no Phase utiliza o pressuposto de que uma sequência estimada seja a mesma ou similar a outra já presente na amostra (Stephens *et al.* 2001). Desta forma, os haplótipos existentes

em cada indivíduo não foram determinados e as análises foram conduzidas com a fase gamética desconhecida no Arlequin (Excoffier & Lischer 2010).

A variação observada nas duas regiões gênicas em *E. fusca* e em *O. discolor* é predominante intraindividual. A região Anon em *E. fusca* contém 419 sítios alinhados, dois com inserções/deleções e 79 com substituições nucleotídicas. Em todos 79 sítios com substituições nucleotídicas, este polimorfismo é observado entre as diferentes sequências de um mesmo indivíduo. Já em *O. Discolor*, 409 sítios foram alinhados para esta região, dois com inserções/deleções e 48 com substituição nucleotídicas (45 substituições observadas apenas entre as diferentes sequências dentro de um indivíduo e 3 entre diferentes indivíduos).

O alinhamento da região EF1 $\alpha$  em *E. fusca* contém 761 sítios alinhados, dois com inserções/deleções, 52 substituições nucleotídicas entre as sequências de um mesmo indivíduo e duas substituições entre diferentes indivíduos. Para *O. discolor*, 842 sítios foram alinhados para esta região, dos quais 32 variam entre as sequências dentro de um indivíduo e apenas um varia entre indivíduos (33 substituições nucleotídicas ao todo).

Os índices de diversidade molecular para cada localidade em cada espécie estão resumidos nas tabelas 3.3 para a região nuclear Anon e na 3.4 para a EF1 $\alpha$ . Entre as cinco localidades amostradas para *E. fusca*, a localidade de Rio Pomba apresentou a maior diversidade gênica para a região Anon, embora seja a amostra com menor tamanho. Considerando a região EF1 $\alpha$ , a maior diversidade gênica ocorre na localidade de Alto Caparaó. A localidade de Muriaé apresentou a maior diversidade gênica para a região Anon entre as quatro localidades de coleta de *O. discolor*. Na região EF1 $\alpha$ , as localidades apresentaram valores próximos neste quesito. As heterozigosidades observada e esperada variaram bastante entre as localidades das duas regiões nas duas espécies, porém, o desvio padrão dos

valores estimados é alto, em muitos casos até maior que o próprio valor estimado, impedindo a interpretação destes valores.

O índice  $F_{ST}$  par a par entre as localidades em *E. fusca* foi significativo para apenas dois pares de localidades em cada região nuclear (tabela 3.5). Considerando a região Anon, foram significativas as diferenças entre as localidades de Alto Caparaó e Rio Pomba e entre Muriaé e Rio Pomba. A análise para a região EF1 $\alpha$  foi parcialmente diferente: o par Muriaé/Rio Pomba também é significativamente diferente como na região Anon, porém o outro par com diferenças significativas é Muriaé/Viçosa. Já em *O. discolor*, não houve diferenças significativas para nenhum dos pares de localidades nas duas regiões gênicas (tabela 3.6).

A partição da variação genética pela AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) nas duas espécies para as duas regiões gênicas estudadas confirma a prevalência da variação intraindividual nas amostras (tabela 3.7). Os baixos valores do índice de fixação  $F_{ST}$  entre todas localidades também reforçam a ausência de estruturação genética: em *E. fusca*, igual a 0,01391 e -0,00701 para as regiões Anon e EF1 $\alpha$  respectivamente e em *O. discolor*, -0,00819 e -0,00629. Valores negativos de componentes de variância da AMOVA e nos índices de fixação indicam excesso de heterozigotos na amostra e devem ser interpretados como zero (Long *et al.* 1987; Schneider *et al.* 2000; Jónsdóttir 2001; Tzeng *et al.* 2004). Na seção de perguntas frequentes da versão 2.000 do ARLEQUIN, os autores destacam que valores ligeiramente positivos ou negativos podem ocorrer devido ao acaso na estimativa quando não há estruturação genética, pois o “valor verdadeiro” do índice  $F_{ST}$  é zero.

**Tabela 3. 3.** Índices de diversidade molecular para a região nuclear Anon em *Erythrodiplox fusca* e *Orthemis discolor*. Os índices foram calculados por localidade e na amostra como um todo (total). N – número de indivíduos; S – número de sítios polimórficos; Hap – número estimado de haplótipos;  $\pi$  – diversidade gênica média ao longo dos sítios;  $H_{obs}$  – heterozigozidade observada; e  $H_{esp}$  – heterozigozidade esperada.

Espécie	Localidade	Anon					
		N	S	Hap	$\pi$	$H_{obs}$	$H_{esp}$
<i>E. fusca</i>							
	Alto Caparaó	8	30	15	0,016269 ± 0,009013	0,18750 ± 0,15998	0,22722 ± 0,15726
	Bom Jesus do Madeira	10	41	20	0,019244 ± 0,010375	0,20732 ± 0,17377	0,19666 ± 0,14438
	Muriaé	11	40	21	0,016810 ± 0,009123	0,15909 ± 0,12136	0,17608 ± 0,12467
	Rio Pomba	6	37	11	0,022203 ± 0,012273	0,25676 ± 0,15008	0,25143 ± 0,13962
	Viçosa	8	36	16	0,017820 ± 0,009795	0,20486 ± 0,16943	0,20741 ± 0,13699
	Total	43	81	74	0,018441 ± 0,009604	0,09073 ± 0,11561	0,09539 ± 0,12240
<i>O. discolor</i>							
	Bom Jesus do Madeira	12	25	12	0,008274 ± 0,004880	0,13667 ± 0,08633	0,13536 ± 0,07396
	Muriaé	10	29	14	0,010977 ± 0,006277	0,15517 ± 0,06317	0,15481 ± 0,05907
	Rio Pomba	8	22	10	0,007661 ± 0,004673	0,13636 ± 0,08547	0,14242 ± 0,08547
	Viçosa	13	30	14	0,007485 ± 0,004472	0,10256 ± 0,06494	0,10205 ± 0,06703
	Total	43	32	50	0,008496 ± 0,004845	0,06977 ± 0,05831	0,06950 ± 0,05819

**Tabela 3. 4.** Índices de diversidade molecular para a região nuclear EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplox fusca* e *Orthemis discolor*. Os índices foram calculados por localidade e na amostra como um todo (total). N – número de indivíduos; S – número de sítios polimórficos; Hap – número estimado de haplótipos;  $\pi$  – diversidade gênica média ao longo dos sítios; H<sub>obs</sub> – heterozigozidade observada; e H<sub>esp</sub> – heterozigozidade esperada.

Espécie	Localidade	EF1 $\alpha$					
		N	S	Hap	$\pi$	H <sub>obs</sub>	H <sub>esp</sub>
<i>E. fusca</i>							
	Alto Caparaó	6	26	9	0,007765 $\pm$ 0,004460	0,12821 $\pm$ 0,08573	0,22727 $\pm$ 0,08266
	Bom Jesus do Madeira	8	22	10	0,004884 $\pm$ 0,002902	0,10227 $\pm$ 0,06264	0,16894 $\pm$ 0,06232
	Muriaé	8	8	6	0,001599 $\pm$ 0,001199	0,15625 $\pm$ 0,08839	0,15208 $\pm$ 0,07660
	Rio Pomba	7	13	6	0,002917 $\pm$ 0,001912	0,17582 $\pm$ 0,08559	0,17075 $\pm$ 0,07242
	Viçosa	8	19	6	0,003953 $\pm$ 0,002428	0,16447 $\pm$ 0,07280	0,15833 $\pm$ 0,06048
	Total	37	56	30	0,004019 $\pm$ 0,002342	0,04229 $\pm$ 0,03080	0,05462 $\pm$ 0,04988
<i>O. discolor</i>							
					$\pm$	$\pm$	$\pm$
	Bom Jesus do Madeira	12	17	13	0,003572 $\pm$ 0,002147	0,12745 $\pm$ 0,08896	0,17690 $\pm$ 0,13426
	Muriaé	13	18	13	0,003187 $\pm$ 0,001947	0,12821 $\pm$ 0,09513	0,14906 $\pm$ 0,11794
	Rio Pomba	13	14	14	0,003161 $\pm$ 0,001934	0,19231 $\pm$ 0,18291	0,19011 $\pm$ 0,13089
	Viçosa	13	15	16	0,003113 $\pm$ 0,001911	0,12821 $\pm$ 0,09496	0,17477 $\pm$ 0,14977
	Total	51	32	37	0,003254 $\pm$ 0,001926	0,07108 $\pm$ 0,09247	0,08562 $\pm$ 0,11329

**Tabela 3. 5.** Índice  $F_{ST}$  entre os pares de localidades de coleta em *Erythrodiplax fusca*. Os valores abaixo da diagonal são os índices  $F_{ST}$  para a região Anon e os valores acima, para a EF1 $\alpha$ . Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; C – Alto Caparaó; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*”.

	C	BJ	M	RP	V
C	-	-0,0085	0,05918	-0,00764	0,02395
BJ	0,01462	-	-0,0085	-0,01413	-0,01629
M	-0,00495	0,01153	-	0,02624*	0,03429*
RP	0,08629*	-0,0138	0,07688*	-	0,00107
V	0,01441	-0,01217	-0,01092	0,03117	-

**Tabela 3. 6.** Índice  $F_{ST}$  entre os pares de localidades de coleta em *Orthemis discolor*. Os valores abaixo da diagonal são os índices  $F_{ST}$  para a região Anon e os valores acima, para a EF1 $\alpha$ . Abreviações usadas para as localidades: BJ – Bom Jesus do Madeira; M – Muriaé; RP – Rio Pomba; e V – Viçosa. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão marcadas pelo “\*”.

	BJ	M	RP	V
BJ	-	0,01389	-0,01049	0,00917
M	-0,00398	-	-0,01034	0,00777
RP	-0,00347	-0,01586	-	-0,00488
V	0,00264	-0,00944	-0,02650	-

**Tabela 3. 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) para as regiões nucleares Anon e EF1 $\alpha$  em *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*.

Espécie	Região gênica	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Componente de Variância	Porcentagem da variação
<i>E.fusca</i>	Anon	Entre localidades	4	0,05391	1,39%
		Entre indivíduos dentro das localidades	38	0,14761	3,81%
		Intraindividual	43	3,67442	94,80%
		Total	85	3,87594	
		EF1 $\alpha$			
		Entre localidades	4	-0,01093	-0,70%
		Entre indivíduos dentro das localidades	32	0,36726	23,56%
		Intraindividual	37	1,20270	77,14%
		Total	73	1,55903	
	<i>O. discolor</i>	Anon	Entre localidades	3	-0,01420
Entre indivíduos dentro das localidades			39	0,00401	0,23%
Intraindividual			43	1,74419	100,59%
Total			85	1,73400	
EF1 $\alpha$					
		Entre localidades	3	-0,00862	-0,63%
		Entre indivíduos dentro das localidades	47	0,24159	17,63%
		Intraindividual	51	1,13725	83,00%
		Total	101	1,37022	

Em conjunto, as análises genéticas deste trabalho indicam a ausência de estruturação populacional tanto para *E. fusca* quanto para *O. discolor*. Dessa forma, nem a barreira de altitude da Serra do Brigadeiro, nem a distância geográfica entre as localidades constituem barreiras ao fluxo gênico e as localidades podem ser consideradas pertencentes a uma única população panmítica em ambas espécies. Estes resultados sugerem que, apesar das diferenças de comportamento de voo

nas áreas de coleta, não há diferenças na capacidade de dispersão das duas espécies nesta escala em estudo. Neste caso, a ocorrência de uma única população indica que ambas espécies têm capacidade de voo similar entre os habitats analisados, o que pode ser relacionado à defesa territorial. Espécies territoriais, como *E. fusca* e *O. discolor*, precisam defender ou obter novos territórios e, por isso, devem apresentar maior capacidade de dispersão do que espécies não territoriais. Por exemplo, em *Coenagrion mercuriale* (Zygoptera, Odonata), uma espécie não territorial, foi observada diferenciação genética significativa entre grupos devido à existência de uma barreira de altitude (Watts *et al.* 2004), podendo ser considerada uma voadora fraca. No entanto, cabe ressaltar que os resultados deste capítulo são restritos a uma escala regional, sendo necessários estudos com área geográfica ampla, uma vez que ambas espécies apresentam distribuição neotropical. A falta de estruturação genética observada pode estar relacionada diretamente aos marcadores moleculares adotados, que não apresentam a variabilidade necessária para diferenciar os indivíduos entre as localidades estudadas, sugerindo que o fluxo gênico entre as localidades é suficiente para que não sejam detectadas diferenças entre elas com estes marcadores. Além disso, trabalhos comportamentais e experimentos de marcação e recaptura são essenciais para aprofundar a comparação da capacidade dispersiva entre *E. fusca* e *O. discolor*.

Outra questão que deve ser ressaltada é a natureza da variação intraindividual, que pode ser decorrente da variação nos alelos de um loci (indivíduos heterozigotos) ou da variação entre diferentes cópias destes genes. Cópias parálogas do gene EF1 $\alpha$  já foram encontradas em outros insetos, como em abelhas (Danforth & Ji 1998) e drosófilas (Hovemann *et al.* 1988), e parece ser uma condição comum entre os insetos holometábolos (Danforth & Ji 1998; Djernæs & Damgaard 2006). Quanto a região Anon, justamente por ser uma região com

função desconhecida, não há informações disponíveis na literatura sobre o número de cópias no genoma. De qualquer modo, as análises executadas em qualquer grupo de organismos com estas regiões devem ser consideradas com cautela, pois as análises filogenéticas e filogeográficas assumem que as sequências dadas no alinhamento são cópias ortólogas de um gene.

## CONCLUSÕES GERAIS

A proposta deste trabalho foi abordar as diferenças na capacidade de dispersão entre duas espécies de Odonata consideradas pousadoras: *Erythrodiplax fusca* e *Orthemis discolor*, mas que, apesar disso, apresentam comportamentos marcadamente diferentes quanto ao tempo que permanecem pousadas e as distâncias percorridas durante o voo. As variações morfológica e molecular não corroboram a hipótese inicial deste trabalho, de que *E. fusca* apresentaria maior estruturação populacional devido a menor mobilidade e distância percorrida durante o voo. De acordo com as análises genéticas, há fluxo gênico suficiente entre as localidades de coleta para as duas espécies para homogeneizar as frequências dos genes em estudo, sem formação de subgrupos isolados. Já a morfometria geométrica das asas indica dois padrões diferentes de agrupamento nas duas espécies, mas que não refletem necessariamente diferenças na capacidade de dispersão destas.

Marcadores morfológicos e moleculares refletem diferentes fatores na formação de subgrupos. Os marcadores moleculares, tipicamente neutros, informam predominantemente sobre eventos de fluxo gênico e deriva genética. Já a morfologia, diretamente afetada pelas condições ambientais, tem maior potencial na detecção de eventos de seleção e plasticidade fenotípica. A análise de diferenciação morfológica entre populações pode fornecer uma boa indicação de divergência entre diferentes entidades, uma vez que características morfológicas são mais provavelmente controladas por múltiplos loci (Garnier *et al.* 2005).

A concordância entre dados genéticos e morfológicos em estudos populacionais já foi reportada em outros trabalhos, como em *Phlebotomus papatasi* (Diptera), sendo a variação morfológica e genética correlacionada às diferenças de altitude das populações (Belen *et al.* 2004), e no besouro *Carabus solieri* (Garnier *et al.* 2005). A falta de congruência entre marcadores morfológicos e moleculares, por outro lado, é mais difícil de ser interpretada. A formação de dois grupos

morfológicos em *E. fusca* e em *O. discolor*, sem estruturação genética, permite apenas sugerir que a diferenciação morfológica dos subgrupos ocorre mais rapidamente do que a diferenciação genética. Esta observação pode ser apoiada em estudos com pares de espécies próximas, onde há uma clara diferença morfológica, mas diferenças genéticas reduzidas ou inexistentes (Nice & Shapiro 1999; Pilgrim & Dohlen 2007). Entretanto, a hipótese de os marcadores genéticos adotados não serem adequados para avaliar as questões intraespecíficas não deve ser descartada.

Grande parte das dificuldades enfrentadas neste trabalho se deve à ausência de dados comportamentais, de marcadores moleculares e protocolos de trabalho para ambas espécies e em Odonata como um todo. Neste contexto, este trabalho contribui expressivamente para a expansão dos conhecimentos das duas espécies. A presença de cópias nucleares de genes mitocondriais (NUMTS) e o extenso polimorfismo intraindividual de origem não determinada (indivíduos heterozigotos ou diferentes cópias gênicas) indicam que os trabalhos baseados na variação genética em Odonata devem ser conduzidos com cautela. Diante destas questões, o sequenciamento direto de produtos de amplificação é uma estratégia ruim, que deve ser evitada nos trabalhos subsequentes. Precisamente quanto aos marcadores nucleares, sugere-se que sejam desenhados “primers” que permitam a amplificação do gene completo e que sejam adotadas etapas de clonagem destes produtos amplificados, com a finalidade de separar as diferentes cópias e identificar a origem da variação intraindividual.

Dentro da literatura consultada, este é o primeiro estudo em Odonata que compara marcadores morfológicos e moleculares no nível intraespecífico. Em todos os casos e hipóteses levantados, é necessário que trabalhos mais detalhados foquem nas diferenças ambientais entre as localidades, bem como a avaliação e

observação das variáveis comportamentais de em *E fusca* e *O. discolor* nos diferentes corpos d'água.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altamiranda-S M, Ortega-M O (2012) Population structure of *Polythore gigantea* (Odonata: Polythoridae) in lotic systems with different conservation states in Antioquia-Colombia. *Revista de Biología Tropical*, **60**, 1205–16.
- Aoki G, Matsui M, Nishikawa K (2013) Mitochondrial cytochrome B phylogeny and historical biogeography of the tohoku salamander, *Hynobius lichenatus* (Amphibia, Caudata). *Zoological Science*, **30**, 167–73.
- Awise JC, Arnold J, Ball RM *et al.* (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Belen A, Alten B, Aytekin AM (2004) Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 343–50.
- Bertheau C, Schuler H, Krumböck S, Arthofer W, Stauffer C (2011) Hit or miss in phylogeographic analyses: the case of the cryptic NUMTs. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 1056–9.
- Berthier K, Chapuis M-P, Moosavi SM, Tohidi-Esfahanil D, Sword GA (2011) Nuclear insertions and heteroplasmy of mitochondrial DNA as two sources of intra-individual genomic variation in grasshoppers. *Systematic Entomology*, **36**, 285–299.
- Bitner-Mathe BC, Klaczko LB (1999) Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica*, **105**, 203–210.
- Bookstein FL (1997) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge Univ Pr.
- Bots J, Breuker CJ, Kaunisto KM *et al.* (2012) Wing shape and its influence on the outcome of territorial contests in the damselfly *Calopteryx virgo*. *Journal of Insect Science (Online)*, **12**, 96.
- Bridge ES, Jones AW, Baker AJ (2005) A phylogenetic framework for the terns (Sternini) inferred from mtDNA sequences: implications for taxonomy and plumage evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **35**, 459–69.
- Claude J (2008) *Morphometrics with R*. Springer.
- Conrad KF, Willson KH, Harvey IF, Thomas CJ, Sherratt TN (1999) Dispersal characteristics of seven odonate species in an agricultural landscape z. *Ecography*, **5**, 524–531.
- Corbet PS (1983) *A Biology of Dragonflies*. E. W. Classey.

- Cristiano MP, Fernandes-Salomão TM, Yotoko KSC (2012) Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*, **43**, 527–538.
- Damm S, Hadrys H (2012) A dragonfly in the desert: genetic pathways of the widespread *Trithemis arteriosa* (Odonata: Libellulidae) suggest male-biased dispersal. *Organisms Diversity & Evolution*, **12**, 267–279.
- Damm S, Schierwater B, Hadrys H (2010) An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. *Molecular Ecology*, **19**, 3881–93.
- Danforth BN, Ji S (1998) Elongation factor-1 alpha occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1 alpha sequences in insects. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 225–235.
- Demayo CG, Harun SA, Torres MAJ (2011) Procrustes Analysis of Wing Shape Divergence among Sibling Species of *Neurothemis* Dragonflies. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **5**, 748–759.
- Djernæs M, Damgaard J (2006) Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthropod Systematics and phylogeny*, **64**, 45-52.
- Dumont HJ, Vanfleteren JR, De Jonckheere JF, H Weekers PH (2005) Phylogenetic relationships, divergence time estimation, and global biogeographic patterns of calopterygoid damselflies (Odonata, Zygoptera) inferred from ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, **54**, 347–62.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792–7.
- Ewing B, Green P (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, **8**, 186–194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, **8**, 175–185.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–7.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fernandes-Salomão TM, Rocha RB, Campos LAO, Araújo EF (2005) The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Sociaux*, **52**, 11–18.

- Floate KD, Fox AS (2000) Flies Under Stress: A Test of Fluctuating asymmetry as a Biomonitor of Environmental Quality. *Ecological Applications*, **10**, 1541–1550.
- Flot J-F (2007) Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 974–977.
- Flot J-F (2010) SEQPHASE: a Web Tool for Interconverting Phase Input/Output Files and Fasta Sequence Alignments. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 162–6.
- Flot J-F, Tillier A, Samadi S, Tillier S (2006) Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 627–630.
- Frazier MR, Harrison JF, Kirkton SD, Roberts SP (2008) Cold rearing improves cold-flight performance in *Drosophila* via changes in wing morphology. *The Journal of Experimental Biology*, **211**, 2116–22.
- Fukuda M, Wakasugi S, Tsuzuki T *et al.* (1985) Mitochondrial DNA-like sequences in the human nuclear genome. *Journal of Molecular Biology*, **186**, 257–266.
- Garnier S, Magniez-Jannin F, Rasplus J-Y, Alibert P (2005) When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 269–80.
- Garrison RW, Ellenrieder N von, Louton JA (2006) *Dragonfly Genera of the New World: An Illustrated and Annotated Key to the Anisoptera*. JHU Press.
- Giere S, Hadrys H (2006) Polymorphic microsatellite loci to study population dynamics in a dragonfly, the libellulid *Trithemis arteriosa* (Burmeister, 1839). *Molecular Ecology Notes*, **6**, 933–935.
- Gingerich PD (2009) Rates of Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 657–675.
- Glenn TC, Schable NA (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, **395**, 202–222.
- Goldstein DB, Schlotterer C (1999) *Microsatellites: evolution and applications*. OXFORD.
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*, **8**, 195–202.
- Gyulavári HA, Felföldi T, Benken T (2011) Morphometric and molecular studies on the populations of the damselflies *Chalcolestes viridis* and *C. parvidens* (Odonata, Libellulidae). *International Journal of Odonatology*, **14**, 329–339.
- Hadrys H, Wargel A, Giere S, Kraus B, Streit B (2007) A panel of microsatellite markers to detect and monitor demographic bottlenecks in the riverine dragonfly *Orthetrum coerulescens* F. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 287–289.

- Hassall C, Thompson DJ, Harvey IF (2007) Wings of *Coenagrion puella* vary in shape at the northern range margin (Odonata : Coenagrionidae). *International Journal of Odonatology*, **11**, 35–41.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**, 313–21.
- Heckman CW (2006) *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata - Anisoptera*. Springer.
- Hernández-L N, Barragán a R, Dupas S, Silvain J-F, Dangles O (2010) Wing shape variations in an invasive moth are related to sexual dimorphism and altitude. *Bulletin of Entomological Research*, **100**, 529–41.
- Herrera MS, Realpe E, Salazar C (2010) A neotropical polymorphic damselfly shows poor congruence between genetic and traditional morphological characters in Odonata. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **57**, 912–7.
- Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P *et al.* (2009) Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, **10**, 11.
- Hovemann B, Richter S, Walldorf U, Cziepluch C (1988) Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Research*, **16**, 3175–94.
- Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J *et al.* (2002) Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 447–457.
- Jónsdóttir O (2001) Genetic differentiation among Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in Icelandic waters: temporal stability. *ICES Journal of Marine Science*, **58**, 114–122.
- Jordan S, Simon C, Polhemus D (2003) Molecular Systematics and Adaptive Radiation of Hawaii's Endemic Damselfly Genus *Megalagrion* (Odonata: Coenagrionidae). *Systematic Biology*, **52**, 89–109.
- Keller D, Brodbeck S, Flöss I, Vonwil G, Holderegger R (2010) Ecological and genetic measurements of dispersal in a threatened dragonfly. *Biological Conservation*, **143**, 2658–2663.
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 353–7.
- Koizumi N, Quinn TW, Jinguji H *et al.* (2011) Development and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for *Sympetrum frequens*. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 67-70.

- Koutroumpa FA, Lieutier F, Roux-Morabito G (2009) Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome (Numts) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **47**, 141–148.
- Kuclu O, Aldemir A, Demirci B (2011) Altitudinal variation in the morphometric characteristics of *Aedes vexans* Meigen from northeastern Turkey. *Journal of Vector Ecology*, **36**, 30–41.
- Lee Y-H, Lin C-P (2012) Pleistocene speciation with and without gene flow in *Euphaea* damselflies of subtropical and tropical East Asian islands. *Molecular Ecology*, **21**, 3739–56.
- Long JC, Smouset PE, Wood JW (1987) The Allelic Correlation Structure Of Gainj- and Kalam-Speaking People. II. The Genetic Distance Between Population Subdivisions. *Genetics*, **117**, 273–283.
- Lopez J V, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJ (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 174–190.
- Magnacca KN, Brown MJF (2010) Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprosopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC evolutionary biology*, **10**, 174.
- Marco Jr P, Resende DC (2004) Cues for territory choice in two tropical dragonflies. *Neotropical Entomology*, **33**, 397–401.
- Milá B, Toews DPL, Smith TB, Wayne RK (2011) A cryptic contact zone between divergent mitochondrial DNA lineages in southwestern North America supports past introgressive hybridization in the yellow-rumped warbler complex (Aves: *Dendroica coronata*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 696–706.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, A'Hara SW, Amouroux P *et al.* (2012) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2011–30 September 2011. *Molecular ecology resources*, **12**, 185–9.
- Monteiro LR, Reis SF (1999) *Princípios de morfometria geométrica*. Holos.
- Moraes EM, Yotoko KSC, Manfrin MH, Solferini VN, Sene FM (2009) Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, **36**, 2136–2147.
- Nice CC, Shapiro AM (1999) Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 936–950.
- Outomuro D, Johansson F (2011) The effects of latitude, body size, and sexual selection on wing shape in a damselfly. *Biological Journal of the Linnean Society*, **102**, 263–274.

- Palacino-Rodríguez F, Contreras-Sánchez NA, Córdoba-Aguilar A (2012) Population structure in dry and rainy seasons in *Erythrodiplax umbrata* (Linnaeus, 1758) (Odonata: Libellulidae). *Odonatologica*, **41**, 245 – 249.
- Paulson DR, Dunkle SW (1999) *A Checklist of North American Odonata*. Slater Museum of Natural History: University of Puget Sound.
- Pilgrim EM, Dohlen CD Von (2007) Molecular and Morphological Study of Species-Level Questions Within the Dragonfly Genus *Sympetrum* (Odonata: Libellulidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **100**, 688–702.
- Pitchers W, Pool JE, Dworkin I (2013) Altitudinal clinal variation in wing size and shape in African *Drosophila melanogaster*: one cline or many? *International Journal of Organic Evolution*, **67**, 438–52.
- Pons J, Barraclough T, Gomez-Zurita J *et al.* (2006) Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, **55**, 595–609.
- Prugnolle F, de Meeus T (2002) Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, **88**, 161–5.
- R Development Core Team (2008) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H (2008) Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275**, 237–247.
- Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CGB, Casari SA, Constatino R (Eds.) (2002) *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Holos.
- Resende HC, Yotoko KSC, Delabie JHC *et al.* (2010) Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **101**, 949–960.
- Richly E, Leister D (2004) NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular biology and evolution*, **21**, 1081–4.
- Rohlf FJ (2005) tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.0. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook*.
- Rohlf FJ (2010) TpsRelw—thin plate spline relative warp analysis. version 1.49. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook*.
- Rohlf FJ (2013) tpsSmall v1.28. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook*.
- Rolim FA, Ribeiro GA (2001) Levantamento do Potencial Turístico do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - PESB com o Suporte em

- Geoprocessamento. In: *Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR)*, pp. 967–969.
- Sadeghi S, Adriaens D, Dumont HJ (2009) Geometric Morphometric Analysis of Wing Shape Variation in Ten European Populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). *Odonatologica*, **38**, 343–360.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN ver 2.000. A Software for Population Genetics Data Analysis. *Software Manual*, 1 – 111.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 978–89.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al.* (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731–9.
- Tzeng T, Yeh S, Hui C (2004) Population genetic structure of the kuruma prawn in East Asia inferred from mitochondrial DNA sequences. *ICES Journal of Marine Science*, **61**, 913–920.
- Vandenbrooks JM (2010) Atmospheric Oxygen and the Evolution of Insect Gigantism. In: *Geological Society of America Abstracts with Programs*, p. 192.
- 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.
- Watts PC (2009) Characteristics of microsatellite loci in Odonata. *International Journal of Odonatology*, **12**, 275–286.
- Watts PC, Rouquette JR, Saccheri IJ, Kemp SJ, Thompson DJ (2004) Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. *Molecular Ecology*, **13**, 2931–2945.
- Watts PC, Thompson DJ, Allen K a., Kemp SJ (2006) How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses? *Journal of Insect Conservation*, **11**, 195–198.
- Webster MS, Reichart L (2005) Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Methods in Enzymology*, **395**, 222–238.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004) *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press.
- Zhang D-X, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 247–251.

# APÉNDICE

## **Apêndice A - Protocolos**

### *Coleta e preparo das libélulas para armazenamento*

1. Os indivíduos devem ser coletados com puçá e imediatamente armazenados em álcool comercial e deixados em isopor até voltar para o laboratório.
2. Incluir as amostras no caderno de coleta, incluindo data, local de coleta e nome dos coletores.
3. Com auxílio da pinça, retirar os indivíduos do frasco pelo abdome.
4. Posicionar o indivíduo com a cabeça para frente e as costas para cima.
5. Retirar as asas com cuidado para não rasgar.
6. Armazenar as asas em cartão branco identificado, com número de tombo do indivíduo e indicação de asas direitas e esquerdas.
7. Armazenar o corpo em álcool comercial no freezer -20°C.

### *Extração de DNA de Odonata – Protocolo Padrão LBE*

1. Macerar o músculo torácico em microtubo de 2,0 ml contendo 1 ml de tampão de extração com proteinase K.
2. Incubar o macerado a 55°C por 30', agitando de 5 em 5'.
3. Esfriar por 10' no gelo.
4. Adicionar 1 ml de fenol-clorofórmio (1:1) e deixar por 10' no gelo, invertendo ocasionalmente os tubos.
5. Centrifugar a 13.000 rpm por 8'.
6. Transferir o sobrenadante para um tubo novo de 2 ml corretamente identificado.

7. Adicionar 1 ml de clorofórmio:alcool-isoamílico (24:1) e deixar 10' no gelo.  
Inverter os tubos algumas vezes.
8. Centrifugar a 13.000 rpm por 8'.
9. Transferir o sobrenadante para um tubo novo de 1.5 ml corretamente identificado.
10. Adicionar isopropanol gelado (-20°C) até encher o tubo.
11. Incubar a -20°C por 24 horas.
12. Centrifugar a 14.000 rpm por 30'.
13. Descartar o sobrenadante.
14. Lavar o pellet duas vezes com etanol 70%. Para isto, adicionar 500 µl de etanol 70% gelado, centrifugar por 2' a 14000 rpm e descartar o etanol.  
Repetir o procedimento.
15. Secar o pellet com tiras finas de papel toalha, com cuidado para não retirar o pellet.
16. Ressuspender o pellet em 30 a 100 µl de TE.
17. Incubar a 4 °C (geladeira) por 2 a 4h.
18. Armazenar a -20°C.

*Extração de DNA de Odonata – Protocolo Modificado LBE*

1. Retirar o tecido muscular do tórax com pinça lavada e esterilizada no fogo e secar o excesso de álcool em papel toalha.
2. Colocar o tecido em microtubos de 2 ml identificados e congelar os tubos (fechados) em nitrogênio líquido.
3. Macerar o tecido no gelo com pistilo plástico até pulverizar o tecido (Macerar enquanto o tecido estiver congelado. Se começar a descongelar, retirar o pistilo, fechar o tubo, congelar novamente e para continuar a maceração).

4. Adicionar a proteinase K ao tampão de extração.
5. Adicionar 1 ml do tampão com proteinase K em cada tubo com tecido macerado.
6. Incubar o macerado a 55°C por 4 horas, agitando ocasionalmente.
7. Esfriar por 10' no gelo.
8. Adicionar 1 ml de fenol-clorofórmio (1:1) e deixar por 10' no gelo, invertendo ocasionalmente os tubos.
9. Centrifugar a 13.000 rpm por 8' (centrífuga refrigerada, se possível).
10. Transferir o sobrenadante para um tubo novo de 2 ml corretamente identificado.
11. Adicionar 1 ml de clorofórmio:alcool-isoamílico (24:1) e deixar 10' no gelo. Inverter os tubos algumas vezes.
12. Centrifugar a 13.000 rpm por 8' (centrífuga refrigerada, se possível).
13. Transferir o sobrenadante para um tubo novo de 1.5 ml corretamente identificado.
14. Adicionar 5 µl de RNase 20 mg/ml e incubar a 37°C por 30'.
15. Incubar por 10' no gelo.
16. Adicionar isopropanol gelado (-20°C) até encher o tubo.
17. Incubar a -20°C overnight.
18. Centrifugar a 14.000 rpm por 30' (centrífuga refrigerada, se possível).
19. Descartar o sobrenadante.
20. Lavar o pellet duas vezes com etanol 70%. Para isto, adicionar 500 µl de etanol 70% gelado, centrifugar por 2' a 14000 rpm e descartar o etanol. Repetir o procedimento.
21. Secar o pellet com tiras finas de papel toalha, com cuidado para não retirar o pellet.
22. Ressuspender o pellet em 30 a 100 µl de TE.

23. Incubar a 4°C (geladeira) por 2 a 4h.

24. Armazenar a -20°C.

*Extração de DNA de Odonata – Protocolo Fernandes Salomão et al. (2005)*

*modificado*

1. Retirar a cabeça da libélula com tesoura lavada e esterilizada no fogo e secar o excesso de álcool em papel toalha.
2. Dividir a cabeça em duas, colocar o em microtubos de 1,5 ml identificados e congelar os tubos (fechados) em nitrogênio líquido.
3. Macerar o tecido no gelo com pistilo plástico até pulverizar o tecido (Macerar enquanto o tecido estiver congelado. Se começar a descongelar, retirar o pistilo, fechar o tubo, congelar novamente e para continuar a maceração).
4. Adicionar 900 µl do tampão de extração com proteinase K (preparado na hora) em cada tubo com tecido macerado.
5. Incubar o macerado a 65°C por 30 a 40', agitando de 10 em 10'.
6. Esfriar por 2' no gelo.
7. Centrifugar 12000 rpm por 5' e transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 ml.
8. Adicionar 1 V de fenol-clorofórmio (1:1) e homogeneizar lentamente 10' no gelo.
9. Centrifugar a 12000 rpm por 10'.
10. Transferir o sobrenadante para um microtubo novo de 1,5 ml corretamente identificado, com a p200.
11. Adicionar 1 V de clorofórmio e homogeneizar lentamente 10' no gelo.
12. Centrifugar a 12000 rpm por 10'.

13. Transferir o sobrenadante para um microtubo novo de 1,5 ml corretamente identificado, com a p200. Ajustar o volume com água ultrapura autoclavada para 1 ml e dividir 500 µl para cada tubo.
14. Adicionar 5 µl de RNase 20 mg/ml por tubo e incubar a 37°C por 30'.
15. Adicionar 1V de isopropanol gelado (-20°C) e 50 µl de NaCl 5M.
16. Incubar a -20°C overnight.
17. Centrifugar entre 12000 e 13000 rpm por 30'.
18. Descartar o sobrenadante.
19. Lavar o pellet com etanol 70%. Para isto, adicionar 500 µl de etanol 70% gelado, centrifugar por 3' a 13000 rpm e descartar o etanol. Repetir o procedimento mais duas vezes.
20. Centrifugar sem adicionar etanol por mais 3'. Retirar o excesso de álcool com pipeta.
21. Secar o pellet entre 20 a 25' na geladeira, com os tubos cobertos por papel.
22. Ressuspender o pellet em 50 µl de TE.
23. Incubar a 4 °C (geladeira) até o outro dia. Vortexar rapidamente.
24. Armazenar a -20 °C.

*Quantificação em gel de agarose 0,8%*

1. Preparar quantidade necessária de TBE 1X para fazer o gel e preencher a cuba (O tampão da cuba deve ser trocado semanalmente, ou antes, se estiver muito sujo) Usaremos 100 ml como exemplo:

$$c \cdot v = c' \cdot v'$$

$$10 \cdot x = 1 \cdot 100 \text{ ml}$$

$$x = 10 \text{ ml de TBE 10X}$$

Misturar 10 ml de TBE 10X com 90 ml de água destilada.

2. Pesar a quantidade de agarose necessária:

$$100\% = 100 \text{ ml}$$

$$0,8\% = x$$

$$x = 0,8 \text{ g de agarose}$$

No erlenmeyer, juntar 100 ml de TBE 1X e a agarose pesada.

3. Levar o erlenmeyer tampado com papel ao microondas pelo tempo necessário para a agarose fundir. Não deixar ferver e parar ocasionalmente para mexer.
4. Resfriar o gel sob água corrente, colocar no suporte e deixar polimerizar.
5. Enquanto o gel polimeriza, preparar as amostras e o marcador de quantidade:
  - Colocar 3  $\mu\text{l}$  de marcador de quantidade (pelo menos dois marcadores de quantidades diferente, idealmente 25 e 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) em 2  $\mu\text{l}$  de Gelred.
  - Colocar 3  $\mu\text{l}$  de cada amostra de DNA em em 2  $\mu\text{l}$  de Gelred.
6. Cuidadosamente, colocar o gel na cuba e retirar os pentes.
7. Aplicar as amostras nas canaletas.
8. Montar a cuba, observando a ordem correta dos cabos (o DNA corre em direção ao polo positivo) e a voltagem máxima suportada pela cuba.
9. Após a corrida, fotodocumentar o gel sob luz ultravioleta.
10. Estimar visualmente a quantidade de DNA, lembrando que foi aplicado um volume de 3  $\mu\text{l}$  de DNA.

#### *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

1. Cada reação terá um volume total de 25  $\mu\text{l}$ , 23  $\mu\text{l}$  de MIX PCR e 2  $\mu\text{l}$  de solução de DNA.

- Inicialmente diluir a solução estoque de DNA em água ultrapura na proporção de 1:100.
- Preparar o MIX PCR no gelo com ponteiros e microtubos novos. Receita do MIX para o kit Taq Platinum (Invitrogen) para uma reação. Para maior número de reações, fazer as contas proporcionais, sempre considerando 1 ou 2 reações adicionais para não faltar.

Reagente	[ ] no estoque	[ ] no MIX	Volume para 1 reação
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	14,8 µl
Tampão	10 X	1X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1 µl
dNTPs	2 mM	0,2 mM	2,5 µl
"Primer forward"	5 µM	0,2 µM	1 µl
"Primer reverse"	5 µM	0,2 µM	1 µl
Taq DNApolimerase	5 U/µl	1 U/reação	0,2 µl

- Retirar todos os reagentes do freezer (exceto a Taq polimerase que só pode ser retirada na hora do uso) centrifugar, homogeneizar e colocar no gelo.
- Colocar a água num tubo de 1,5ml e depois todos os reagentes. A Taq polimerase deve ser colocada por último e para os primers deve-se usar ponteira com filtro.
- Distribuir o MIX PCR entre os microtubos devidamente identificados e em seguida adicionar o DNA cuidadosamente.
- Colocar as reações no termociclador, de acordo com as condições seguintes:

94°C	2'	} 17 ciclos
94°C	30"	
60°C	30" ↓1°C por ciclo	
72°C	2'	
94°C	30"	} 13 ciclos
47°C	30"	
72°C	2'	
72°C	5'	
4°C	"hold"	

- Quando sair do termociclador, as reações podem ser armazenadas a -20°C.

9. Verificar se as reações funcionaram em gel de agarose 1,5%.

*Envio das amostras para sequenciamento na Macrogen Inc - Korea*

1. Preencher a tabela de pedido fornecida pelo site <http://dna.macrogen.com> e fazer o pedido online.
2. Aliquotar 15 µl de cada amostra em microtubo de 1,5 ml para cada reação de sequenciamento com a mesma identificação usada na tabela do pedido.
3. Vedar os microtubos com “parafilm” e acondicionar em saco plástico com fecho.
4. Em caixa da FEDEX, acomodar os tubos embalados e uma cópia da tabela do pedido, com o número do pedido feito no site.
5. Agendar a coleta no FEDEX.
6. Endereço para envio:

Macrogen Inc.

908 World Meridian Venture Center

\# 60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu

Seoul 153-781, Korea