UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Novas perspectivas no estudo de Ephemeroptera neotropical: DNA-barcode e morfometria geométrica

Taís Barbosa Almeida

Vitória, ES Setembro, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Novas perspectivas no estudo de Ephemeroptera neotropical: DNA-barcode e morfometria geométrica

Taís Barbosa Almeida

Orientadora: Roberta Paresque Coorientador: Frederico Falcão Salles

> Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Biologia Animal

Vitória, ES Setembro, 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Almeida, Taís Barbosa, 1990-

A447n

Novas perspectivas no estudo de Ephemeroptera neotropical: DNA-barcode e morfometria geométrica / Taís Barbosa Almeida. - 2021. 101 f. : il.

Orientadora: Roberta Paresque.

Coorientador: Frederico Falcão Salles.

Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Ephemeroptera. 2. Biologia molecular. 3. Evolução. 4. Morfologia. 5. Asas. I. Paresque, Roberta. II. Salles, Frederico Falcão. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Membros da banca examinadora:

Dr^a. Roberta Paresque (Orientadora)

Dr. Yuri Luiz Reis Leite (Membro Interno)

Dr. Pitágoras da Conceição Bispo (Membro Externo)

Dr^a. Jeane Marcelle Cavalcante do Nascimento (Membro Externo)

> Dr^a. Lucimar Gomes Dias (Membro Externo)

Dr^a. Ana Carolina Loss Rodrigues (Suplente Interno)

Dr. Luiz Roberto Ribeiro Faria Júnior (Suplente Externo)

Vitória, 29 de setembro de 2021

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo incentivo e apoio incondicional, por me ensinarem tudo que sei e serem a base de quem eu sou. A minha mãe, Cristina, pelo companheirismo e apoio incansável. Esteve presente nos momentos mais difíceis desse caminho, foi sempre meu porto seguro e minha referência do que é ser forte e determinada. A minha irmã, Andiara, por todo carinho, proteção e cuidado que sempre teve com sua irmã caçula. É aquela que se orgulha até do branco do meu olho, que conta pra todo mundo que a "irmãzinha" faz doutorado. Só sei que essa admiração é recíproca e sem você certamente eu não teria chegado ao fim desse doutorado. Ao meu irmão, Lucas, que jamais me deixou na mão em qualquer situação difícil que eu tenha passado na vida e sempre esteve ao meu lado quando precisei, e nas incansáveis consultas médicas gratuitas que ele é obrigado a me fornecer. Ao meu pai, Antônio (in memorian), que apesar de não estar mais aqui, definitivamente foi meu maior exemplo da área acadêmica, um excelente médico, professor da EMESCAN, mestre em pediatria e estava prestes a se tornar doutor pela UFMG antes de seu falecimento. À minha avó Cléria (*in memorian*), por toda doçura e amor que me deu, sinto saudades de você todos os dias vó! Jamais conseguirei expressar o suficiente quanto amo vocês.

Ao Gabriel, por todo o amor, companheirismo e paciência que teve comigo ao longo desses anos, certamente você sabe o quão árduo foi esse caminho e percorreu comigo sem soltar a minha mão. Foi meu colo quando precisei e meu maior incentivador para continuar. Me deu apoio emocional, dormiu muitos dias com a luz do computador acesa, para que eu trabalhasse até de madrugada, e até discutiu sobre a estrutura das asas de Ephemeroptera para me ajudar no raciocínio. Sou muito grata por ter você e o Tintim em minha vida!

A Roberta, gratidão primeiramente pela amizade construída, desde 2006, haja tempo que nos conhecemos! Obrigada por ser uma orientadora tão parceira, acolhedora e que sempre me ensinou os caminhos a serem seguidos. Desde o mestrado esteve comigo e abriu as portas do mundo da pesquisa para aquela menina bióloga de 2014. Obrigada por sempre ter confiado no meu trabalho e ter feito parte da minha transformação como pesquisadora! Gratidão por todo o suporte, especialmente nesse final interminável que parecia mais um episódio de Caverna dos Dragões. Sem você certamente não chegaria até aqui. Amo você e as meninas!!!!

Ao Fred, obrigada por todos os ensinamentos tão vastos que só você tem, por ter me inserido no grupo mais fascinante de todos os insetos existentes! Sempre digo que tenho dois orientadores, e de fato tenho. Desde o mestrado sigo seus passos com muito orgulho! Obrigada pela tranquilidade que transmite sempre, a qual me deixava confiante para seguir na estrada desse doutorado. Obrigada por tudo Fred!!!

A Cecília Waichert, Carol Loss e a Tathiana Guerra Sobrinho, por fazerem da minha qualificação um momento de grandes aprendizados. Foi uma época que passei por uma grande crise de ansiedade e vocês foram extremamente solícitas, acolhedoras e gentis comigo. Serei eternamente grata por tudo e a academia certamente merece ter pessoas como vocês de exemplo! A Paula Souto e ao Albert Ditchfield, pela tutoria e todos os comentários que auxiliaram o encaminhamento desta tese. Ao Dr. Og de Souza (Universidade Federal de Viçosa) por facilitar o uso do equipamento óptico. Aos meus queridos amigos Mateus e Carol, por todo o acolhimento possível, pelas conversas, alegrias e tristezas que compartilhamos, pela ajuda nas análises dos dados no R, discussões e comentários que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Sem vocês certamente eu não teria conseguido. Mateus, sem você especialmente esse final seria impossível, toda a ajuda e suporte que você me deu com a tese não tem preço, vou ser sempre grata pela nossa amizade! A Thay, que me acolheu em Viçosa em sua casa, me ajudou com tudo que precisei no museu, além de claro ser uma grande amiga que está ao meu lado desde o LABSEI, sou muito grata pela nossa amizade! Aos meus eternos amigos de LABSEI, CEUNES ou simplesmente da vida, Vini, Bonfá, Dani, Sanders, Breno, Marcelli, Victor, Rosi, Roberta, Gabi, Alice, Bia, Priscilla e Cecília, eu amo tanto vocês! Ao Jhon, pela ajuda com o MorphoJ, TNT e pelo acolhimento no museu.

Aos membros da banca examinadora, que prontamente aceitaram avaliar e contribuir para a melhoria deste trabalho e foram compreensivos com meu pedido de prorrogação da data de defesa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES #8882.385175/2019-01) pelo apoio financeiro. A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por dar todo o suporte necessário para desenvolvimento desta pesquisa.

"Para pequenas criaturas como nós, a vastidão é suportável somente através do amor." **Carl Sagan**

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
APRESENTAÇÃO	11
CAPÍTULO 1: First report on construction of DNA barcode library for Ephemeroptera (Insecta) from Brazil	13
Abstract	15
Introduction	16
Material and Methods	17
Results	20
Discussion	26
A promising future	28
Acknowledgments	28
Author Contributions	29
References	29
Supporting Information	33
CAPÍTULO 2: Desvendando a diversidade e evolução das asas de Hagenı (Ephemeroptera: Leptophlebiidae)	ılinae 44
Resumo	46
Introdução	47
Material e métodos	51
Resultados	56
Discussão	76
Agradecimentos	82
Referências	82
Material Suplementar	90
CONCLUSÃO	96

RESUMO

O objetivo principal desta tese foi incrementar o conhecimento da ordem Ephemeroptera através de ferramentas moleculares (DNA-barcode) e da morfometria geométrica. No primeiro capítulo apresentamos os níveis de variação de sequências mitocondriais de citocromo oxidase I (COI) em quatro famílias brasileiras de Ephemeroptera: Leptophlebiidae, Baetidae, Leptohyphidae e Oligoneuriidae, para verificar se este gene fornece um ponto de referência na tomada de decisões sobre distinções em nível de espécie nessas famílias. Dados de sequência de DNA de 243 espécimes, pertencentes à 40 gêneros, 77 espécies, que abrangem os biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado foram examinados para desenvolver hipóteses de avaliação dos níveis de variação das sequências. Os resultados sugerem que valores de distância genética de até 2% a 5% foram indicativos de variação intraespecífica; valores acima de 6% têm alta probabilidade de serem indicativos de variação interespecífica. No segundo capítulo avaliamos a diversidade morfológica e evolução das asas de Hagenulinae (Leptophlebiidae). Investigamos a partir da morfometria geométrica as variações morfológicas das asas de 130 espécimes pertencentes a quatro subtribos: Hermanellina, Miroculina, Ulmeritina e Hagenulina. Os resultados revelaram uma alometria significativa para as asas anteriores e posteriores, assim o aumento de tamanho das asas possui influência na forma, especialmente nas regiões basais e apicais da asa. Além disso, observou-se que as características das asas posteriores contribuem melhor para a separação das subtribos, indicando que sua forma é importante na evolução das características de voo desse grupo de Ephemeroptera em particular.

8

Palavras-chave: Ephemeroptera, Neotropical, Barcode, Diversidade Morfológica,

Asas.

ABSTRACT

This study aimed to increase the knowledge of the Ephemeroptera order through molecular tools (DNA-barcode) and geometric morphometry. In the first chapter, we present the levels of mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) sequences variation in four Brazilian Ephemeroptera families: Leptophlebiidae, Baetidae, Leptohyphidae, and Oligoneuridae, to verify if this gene can provide a reference point in making decisions about distinctions at species level in Brazilian families of Ephemeroptera. DNA sequence data from 243 specimens, belonging to 40 genera, 77 species, covering the Amazon, Atlantic Forest, Caatinga and Cerrado biomes were examined to develop hypotheses for evaluating the levels of sequence variation. The results suggest that genetic distance values up to 2% to 5% were indicative of intraspecific variation; and values above 6% are highly likely to be indicative of interspecific variation. In the second chapter we evaluate the morphological diversity and evolution of the wings of Hagenulinae (Leptophlebiidae). Using geometric morphometry, we investigated the morphological variations of the wings of 130 specimens belonging to four subtribes: Hermanellina, Miroculina, Ulmeritina, and Hagenulina. The results revealed significant allometry for the fore and posterior wings, thus the increase in the size of the wings influences the shape, especially in the basal and apical regions of the wing. Furthermore, it was observed that the characteristics of the hindwings contribute better to the separation of the subtribes, indicating that their shape is important in the evolution of the flight characteristics of this particular group of Ephemeroptera.

Key-words: Ephemeroptera, Neotropical, Barcode, Morphological diversity, Wings

10

APRESENTAÇÃO

Sobre o desenvolvimento do projeto e os capítulos desta tese

Esta tese teve seu início bem antes do meu ingresso ao doutorado, ainda durante o mestrado, que teve início em 2014, comecei a adentrar para o mundo das efémeras da família Leptophlebiidae e aprofundar meus conhecimentos morfológicos e moleculares. Nosso grupo de estudo vem promovendo grande parte do conhecimento da ordem Ephemeroptera para o Brasil, seguindo os passos do Professor Dr. Frederico Falcão Salles. A partir da união de seu trabalho com a Professora Dra. Roberta Paresque, que trouxe ao nosso grupo conhecimentos moleculares, surgiu a possibilidade de ampliar nosso campo de pesquisa. O projeto Universal "Diversidade e Taxonomia de Ephemeroptera (Insecta) do Espírito Santo", recurso este financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e implementado pela união de trabalho desses professores e seus alunos, teve seu início em 2012 e findou em 2017, financiou muitas teses e dissertações em nosso grupo de pesquisa e propiciou que desenvolvêssemos um banco de dados moleculares para a ordem. Posteriormente, surgiu a ideia de promover o início de uma "livraria" de dados moleculares a partir do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI), com intuito de compreender os padrões de distâncias genéticas intraespecíficos e interespecíficos entre quatro famílias da ordem: Leptophlebiidae, Leptohyphidae, Baetidae e Oligoneuriidae, que por sua vez tornou-se um dos produtos desta tese.

Após o fim do meu mestrado, com o fim do projeto Universal, somando a falta de recursos para continuar a trabalhar com análises moleculares, tivemos que pensar em uma alternativa para desenvolver este projeto. Ainda entusiasmada com a família Leptophlebiidae e suas variações morfológicas intrigantes, propusemos trabalhar com o que já tínhamos disponível em nossa coleção, tanto com nossos dados moleculares, conforme abordado anteriormente, quanto dados morfológicos. A família Leptophlebiidae Banks, 1900 (Insecta: Ephemeroptera) é uma das mais diversificadas dentre os demais efemerópteros, com aproximadamente 140 gêneros e 640 espécies descritas para o mundo (Sartori & Brittain, 2015). Possui distribuição global e tem a maior diversidade de espécies ocorrendo no Neotrópico, onde estão registradas 35% de todas as espécies conhecidas para a família (Pescador, 1997; Barber-James et al. 2008). Recentemente nosso grupo de estudo (Monjardim et al. 2019) propôs uma nova classificação para esta família com base em dados moleculares, e atualmente está dividida em sete subfamílias: Leptophlebiinae Banks, 1900; Atalophlebiinae Peters, 1980; Habrophlebiinae Kluge, 1994; Calliarcyinae Kluge, 2004; Castanophlebiinae Kluge, 2004; Terpidinae Kluge, 2004 e Hagenulinae Kluge, 2008.

Esta última subfamília citada, tornou-se o grupo alvo de um dos capítulos dessa tese, visto que Hagenulinae é uma linhagem extremamente diversa, composta por duas tribos: Miroculini e Hagenulini (Figura 1), as quais por sua vez, são compostas por linhagens e complexos que ainda carecem de estudos para desvendar suas relações internas. Inicialmente nosso projeto previa análises filogenéticas com dados morfológicos contínuos e discretos para o grupo, entretanto, com o início da pandemia, ficamos isolados por um grande período de tempo e impossibilitados de

12

frequentar o laboratório, o que me limitou a continuar a desenvolver as análises com os dados discretos.

Um dos grandes questionamentos que inicialmente nos intrigava era a grande diversidade de tamanho e forma das asas presente no grupo, além da perda da asa posterior em alguns gêneros, como por exemplo *Askola* e *Hagenulopsis* que pertencem à subtribo Hagenulina, e de *Bessierus e Perissophlebiodes* que pertencem à Hermanellina. As asas são caracteres taxonômicos amplamente utilizados para este grupo e compreender sua diversidade e evolução tornou-se um de nossos objetivos. Diversos estudos demonstram que as formas das asas quantificadas por pontos de referência nas veias foram consideradas distintas entre tribos, gêneros, espécies e até mesmo populações isoladas (e.g. Baylac et al. 2003; Camara et al. 2006; Villemant et al. 2007). Desta forma, as análises dos dados de morfometria geométrica mostram-se de grande utilidade para propormos uma avaliação do padrão de diversidade morfológica das asas em Hagenulinae, a fim de entender as mudanças evolutivas presentes na forma e tamanho das asas anteriores e posteriores do grupo.



Figura 1. Representação de Hagenulinae, com suas respectivas tribos, subtribos e gêneros. Modificado de Monjardim et al. 2019.

Esta tese apresenta, portanto, dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta os níveis de variação de sequências mitocondriais de citocromo oxidase I (COI) com o objetivo de verificar se este gene pode fornecer um ponto de referência na tomada de decisões sobre distinções em nível de espécie em quatro famílias brasileiras de Ephemeroptera. Pretendemos submetê-lo ao periódico "*PLOS ONE*" (https://journals.plos.org/plosone/), e por isso o texto já se encontra na formatação exigida.

Por fim, o segundo capítulo propõe uma avaliação da diversidade morfológica e evolução das asas de Hagenulinae, que possui a maioria de suas espécies na região neotropical e ainda apresenta muitas incógnitas taxonômicas para serem desvendadas.

Esse trabalho pretendemos submeter no periódico "Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research" (https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14390469) e por isso o texto já se encontra na formatação necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barber-James, H. M., Gattolliat, J.-L., Sartori, M., & Hubbard, M. D. (2008). Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. Hydrobiologia, Vol. 595, pp. 339–350. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9028-y

Baylac, M., Villemant, C., & Simbolotti, G. (2003). Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. Biological Journal of the Linnean Society, Vol. 80, pp. 89–98. https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00221.x

Camara, M., Caro-Riaño, H., Ravel, S., Dujardin, J.-P., Hervouet, J.-P., De Meeüs, T., Solano, P. (2006). Genetic and morphometric evidence for population isolation of Glossina palpalis gambiensis (Diptera: Glossinidae) on the Loos islands, Guinea. Journal of Medical Entomology, 43(5), 853–860.

Monjardim, M., Paresque, R., & Salles, F. F. (2020). Phylogeny and classification of Leptophlebiidae (Ephemeroptera) with an emphasis on Neotropical fauna. Systematic Entomology, Vol. 45, pp. 415–429. https://doi.org/10.1111/syen.12402 Pescador, M. L. (1997). Gonserellus: A new genus of Leptophlebiidae (Ephemeroptera) from Southern South America. Aquatic Insects, Vol. 19, pp. 237– 242. https://doi.org/10.1080/01650429709361658

15

Sartori, M., & Brittain, J. E. (2015). Order Ephemeroptera. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, pp. 873–891. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385026-3.00034-6

Villemant, C., Simbolotti, G., & Kenis, M. (2007). Discrimination of Eubazus (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. Systematic Entomology, Vol. 32, pp. 625–634. https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.00389.x

CAPÍTULO 1: First report on construction of DNA barcode library for

Ephemeroptera (Insecta) from Brazil.



First report on construction of DNA barcode library for Ephemeroptera (Insecta) from Brazil.

A ser submetido na revista: PLOS ONE (FI: 2.776, Qualis: A1)

Taís Barbosa Almeida¹, Frederico Falcão Salles², Rafael Boldrini³, Fabiana Criste Massariol¹, Kamila Angeli Batista¹, Marina Monjardim¹, Jádila dos Santos Prando⁴, Maria Paula Rozo⁴, Paula Souto⁵, Daniela Maeda Takiya⁴, Roberta Paresque⁶

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

² Museu de Entomologia, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Minas Gerais, Brazil.

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵ Departamento de Ciências e Engenharia de Biossistemas. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

⁶ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil.

Correspondence:

To: Taís Barbosa Almeida

E-mail: tais.barbosaa@gmail.com

Keywords: Taxonomy, Neotropical mayflies, Cytochrome Oxidase I, species identification

Abstract

- Levels of sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I (COI or Barcode region) were examined to ascertain if this gene can provide a reference point in making decisions concerning species-level distinctions in Brazilian families of the Ephemeroptera.
- DNA-sequence data from 40 genera, 77 species, and 4 families of mayflies from Amazon, Atlantic Forest, Caatinga and Cerrado biomes were examined to develop hypotheses for evaluating levels of sequence variation.
- 3. Several patterns associated to DNA-sequence variation emerged from this study: genetic distance values until 2% to 5% were indicative of intraspecific variation; values above 6% had a high probability of being indicative interspecific variation.
- 4. Individuals from operational taxonomic units designated as species of Ephemeroptera formed individual clades, supporting morphological evidence for each of these being separate species. We conclude that sequencing of COI can be used to distinguish Ephemeroptera species.

Introduction

Understanding the taxonomy of members of Ephemeroptera (Insecta) and their systematic relationships has been puzzling for some time [1]. This is especially true for Brazilian biomes. These regions have been considered significant hotspots and include at least four principal Brazilian river basins (Amazon Basin, Basin of São Francisco, Eastern Atlantic Basin and Southeast Atlantic Basin) that interdigitate throughout this area, constituting a diverse territory and associated habitats that give to mayflies populations the opportunity to become isolated, develop, and speciate under several diverse environmental circumstances [2]. Therefore, it has been difficult to analyze morphological variation when this variation is related to recent speciation events, different geographic, climatic, and elevation sources. This is especially true for the general pattern of morphological conservation known among members of the Ephemeroptera species, which has evidence of cryptic species [2] within the group. Furthermore, identifying certain females and some nymphs remains a challenging task, even for specialists [3].

Historically, DNA barcoding (mitochondrial DNA portion denominated COI: Cytochrome c Oxidase I) is the procedure of short DNA sequences for species identification [4]. Since its establishment as an approach for large scale species identification [5–10], several studies have reported the application of COI in a wide range of Ephemeroptera taxa [10–15] However, regarding Ephemeroptera from Brazil, few studies exist on the utility of DNA barcodes for the identification of these mayflies [2],[16]. In order to test the universality of the standard Cytochrome c Oxidase I (barcode region), we applied these loci to four families of Ephemeroptera, and we present the first report on the construction of DNA barcodes for 77 species from Brazilian biomes. We hope to standardize molecular variation intra and interspecific that could distinguish Baetidae, Leptohyphidae, Leptophlebiidae and Oligoneuriidae species. The assembly of DNA barcodes for each species of Ephemeroptera would provide an essential tool for specific identifications and could allow the description of the species biodiversity, and provide a basis for further exploring the taxonomic, phylogenetic and phylogeographic patterns of this group of insects.

Material and Methods

Samples

Specimens used in this study belong to different different biomes from brazil: Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga and Amazon biomes (**Fig 1**). All specimens were stored on 96% ethanol at -6°C, specimen numbers and collection localities are listed in table 1. Vouchers are deposited in the Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Brazil and Coleção Entomológica Prof. José Alfredo Pinheiro Dutra, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (DZRJ). The sample comprising 243 mtDNA sequences representing four families: Baetidae with 15 species and 11 genera, Leptohyphidae with 19 species and 7 genera, Leptophlebiidae with 19 species and 13 genera, and Oligoneuriidae with 15 species and 4 genera. The specimens were identified according to the currently accepted taxonomy, following the main bibliographies of each family. When discrepancies were detected between barcode results and morphological identifications, specimens were reexamined. When specimens could not be identified morphologically (e.g. certain females, some larvae), they were assigned the same name as expertly identified specimens with either the same or a closely similar (<2% divergence) COI sequences. Specimens which formed a unique barcode cluster, but which could not be identified morphologically, were assigned a provisional name structured in a consistent fashion (generic name followed by a species name composed of 'sp.' e.g. *Lachlania* sp.1)



Fig 1. Distribution map for all barcoded specimens of Ephemeroptera of this study with geocoordinates.

Sequence data

DNAs were extracted using a Wizard SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega[®]) and the protocol for animal tissue. Adult males and nymphs, which could be identified confidently, were extracted in two ways. For adult specimens, the abdomen and wing were removed, and all remaining portions were placed in an extraction buffer, for nymphs specimens were used three legs, the remaining portions of specimens were retained as vouchers. An 659 base pair portion of COI was amplified, PCR was performed in a $25-\mu$ L mixture containing approximately 20 ng/µL DNA template; 1X PCR buffer, a 2.0 mM concentration of MgCl₂, a 30µM concentration of each primer: LCO 1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) and HCO 2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) [17], a 100µM concentration (each) of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 1U Tag Platinum DNA Polymerase Invitrogen® and ultrapure water to complete 25µL. Initial PCR consisted of a preheating at 94°C for 5 min; 40 cycles of 94°C for 45 s, 47°C of annealing temperature for 45 s and 72°C for 45 s, and incubation at 72°C for 5 min. Negative controls, which contained all elements of the reaction mixture except DNA, were assigned. Successful bands were detected on 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer. Products were purified using ExoSAP-IT[®] for PCR Product Cleanup (GE Healthcare). All samples were sequenced by Macrogen[®].

DNA sequence analysis

The alignment of sequences was relatively unambiguous as all specimens were length invariable. Sequences were aligned and trimmed to length using Geneious R8, resulting in 659 characters. The basic sequence statistics including nucleotide frequencies were analyzed with the help of DnaSP v5.0 [18].

Pairwise numbers of nucleotide differences were calculated with the program MEGA 6.06 version [19]_using the 'Calculate distances' option and 'Nucleotide: p-distance' model option for distances. The p-distance, the proportion of sites in which two sequences differ, was calculated by dividing the number of nucleotide differences by the total number of nucleotides [8]. Additionally, the Kimura 2-parameter model of evolution [20] was used to calculate genetic distances. These values were then used to assess levels of genetic divergence among species of Ephemeroptera: we hope to find a smaller sequence divergence for intraspecific cases when compared to interspecific values.

Results

All 68 Ephemeroptera species showed distinctive COI sequences; neither was shared between species. These datasets provide coverage for 11% of all Brazilian Baetidae species and 45% of genera; 33% of all Brazilian Leptohyphidae species and 77% of genera; 14% of all Brazilian Leptophebiidae species and 45% of genera, and 47% of all Brazilian Oligoneuriidae species and 80% of genera.

Baetidae

For Baetidae the mean sequence composition in our sequences were A=24.58%, C=11.01%, G=16.99% and T=47.42%. No insertions/deletions or codon stops were found, supporting the view that all of the amplified sequences constitute functional mitochondrial COI sequences. Of the 659 sites, 182 were polymorphic, and 10 singletons and 172 informative sites, revealing 46 haplotypes. The haplotype diversity values (h = 0.9855) and nucleotide diversity (π = 0.18030) were elevated. The lowest interspecific distance was 12.56% (K2P) and 11.38% (p-distance), between *Camelobaetidius francischetti* and *Camelobaetidius rufiventris*, and the maximum was 25.58% (K2P) and 21.49% (p-distance), between *Cloeodes jaragua* and *Cloeodes itajara*. The mean value of interspecific distance for Baetidae was 19.8% (K2P) and 17,22% (p-distance). The values of intraspecific distance varied in Baetidae from 0% to 4.3% (K2P) and 0% to 4.1% (p-distance). The mean value of intraspecific distances was 1% for both analyses.

While for genera, the distance between all genera varied from 17.64% to 25.05% (K2P) and 15.64% to 21.18% (p-distance). The genera with smaller distances from each other were Callibaetis and *Adebrotus*, and greater distances were between *Cloeodes* and *Tomedontus*. The mean value of distance between genera was 21.9% (K2P) and 18.8% (p-distance) (**Table 1**).

Leptohyphidae

For Leptohyphidae the mean sequence composition in our sequences were A=24.65%, C=22.75%, G=18.43% and T=34.15%. No insertions/deletions or codon stops were found, supporting the view that all of the amplified sequences constitute functional mitochondrial COI sequences. Of the 682 sites, 188 were polymorphic and 19 singletons and 266 parsimony informative sites, revealing 23 haplotypes. The haplotype diversity values (Hd = 1.0) and nucleotide diversity (π = 0.21593) were elevated.

The lowest interespecific distance was 7.18% for K2P and 6.75% for p-distance, between *Tricorythopsis chiriguano* and *Tricorythopsis minimus*, and the maximum was 33.48% (K2P) and 26.89% between *Tricorythodes santarita* and *Tricorythodes hiemalis* (p-distance). The mean value of interspecific distance for Leptohyphidae was 26.81% (K2P) and 22.39% (p-distance). The values of intraspecific distance varied in Leptohyphidae from 0.07% to 1.77%(K2P) and 0.03% to 1.75% (p-distance), but we had only a comparison between *M. australis*. The mean value of intraspecific distances was 0.09% (K2P and p-distance). While for genera, the divergence between all genera with two or more species varied from 24.23% to 33.86% (K2P) and 20.43% to 26.54% (p-distance). The mean value of intrageneric distances was 29.09% (K2P) and 23.69% (p-distance) (**Table 1**).

Leptophlebiidae

For Leptophlebiidae the mean sequence composition in our sequences were A=26.27%, C=19.31%, G=17.61% and T=36.79%. No insertions/deletions or codon stops were found, supporting the view that all of the amplified sequences constitute functional mitochondrial COI sequences. Of the 671 sites, 252 were polymorphic and 2 singletons and 244 informative sites, revealing 76 haplotypes. The haplotype diversity values (Hd = 0.985) and nucleotide diversity (π = 0.1635) were elevated. The lowest interespecific distance was 10.64% (K2P) and 9.80% (p-distance), between Miroculis fittkaui and M. caparaoensis, and the maximum was 19.20% (K2P) and 16.77% (p-distance), between *Hydrosmilodon plagatus* and *Hydrosmilodon gilliesae*. The mean value of interspecific distance for Leptophlebiidae was 14.74% (K2P) and 13.30% (p-distance). The values of intraspecific distance varied from 0% to 4.98% (p-distance) and 0% to 5.20% (K2P). While for genera, the divergence between all genera varied from 14.80% to 29.48% (K2P) and 13.34% to 24.16% (p-distance). The genera with smaller distances from each other were *Needhamella* and *Traverella*, and greater distances were between *Ulmeritus* and *Perissophlebiodes*. The mean value of distance between genera was 21.97% (K2P) and 18.81% (p-distance) (Table 1).

Oligoneuriidae

For Oligoneuriidae the mean sequence composition in our sequences were A= 23.67%, C= 15.68 %, G= 19.96 % and T= 40.67%. No insertions/deletions or codon stops were found, supporting the view that all of the amplified sequences constitute functional mitochondrial COI sequences. Of the 616 sites, 127 were polymorphic, and 02 singletons and 227 informative sites, revealing 37 haplotypes. The haplotype diversity values (h = 0.975) and nucleotide diversity (π = 0.156) were elevated.

The lowest interespecific distance was 7.92% (K2P) and 7.46% (p-distance), between *Lachlania* sp4 and *Lachlania alcidesi*, and the maximum was 22.0% (K2P) and 18.98% (p-distance), between *Oligoneuria anatina* and *Oligoneuria amazonica*. The mean value of interspecific distance for Oligoneuriidae was 13.57% (K2P) and 12.26% (p-distance). The values of intraspecific distance varied in Oligoneuriidae from 0% to 3.51% (K2P) and 0% to 3.42% (p-distance). The mean value of intraspecific distance was 0.08% (K2P) and 0.05% (p-distance). While for genera, the divergence within genera with two or more species varied from 14.58% to 18.44% (K2P) and 13.20% to 16.29% (p-distance). The mean value of intrageneric distances was 16.96% (K2P) and 15.10% (p-distance) (**Table 1**).

	Leptohyphidae			Oligoneuriidae		Leptophlebiidae			Baetidae			
	К2р			К2р		К2р			К2р			
Comparison	media	Range	n	medi a	Range	n	media	Range	n	media	Range	n
Intraespecific	0.009	0.007 - 0.017	26	0.008	0.000 - 0.035	47	0.018	0.000-0.052	120	0.010	0.000 - 0.043	50
interespecific	0.268	0.071 - 0.334	19	0.135	0.079 - 0.220	15	0.147	0.106 - 0.192	19	0.198	0.125 - 0.225	15
Intergeneric	0.29	0.242 - 0.338	7	0.169	0.145 - 0.184	4	0.219	0.148-0.294	13	0.219	0.176 - 0.250	11

Table 1. Summary of media, minimum and maximum intraspecific, interespecific and intergeneric divergences (K2p).

Discussion

Our purpose was to assess levels of DNA sequence divergence under the specieslevel differentiation in Ephemeroptera. Explicitly, how predictive are sequencedivergence values, obtained from the COI gene, in identifying species-level differentiation in Ephemeroptera? Determination of how much genetic variation is present in typical populations and between taxa is essential to directing this interrogation, given the presence of the "barcode gap" as a delimiting criterion and an indicator of species differentiation.

Our data indicate that an average level of divergence to genetic divergence intraspecific is approximately 2% with most specimens showing divergence values of about 1%. When comparing geographically distant samples of the same species, the level can reach higher values (approximately 4%), as observed for: *S. diamantinensis* from Espírito Santo and Bahia. Using this logic, we view genetic distance values (2% to 5%), for the cytochrome oxidase I gene, as having a high probability of indicating intraspecific variation in Brazilian Ephemeroptera. If data presented in this paper are predictive, values >6% may be indicative of valid species. *Simothraulopsis plesius* and *Simothraulopsis caliginosus* presented distances ranging from 0% to 2% and according to our analysis this is indicative to intraspecific distances. Therefore, we suggest a review to assess the validation of these species. The bigger the value is, the greater the chance that two biological species may be represented. Our results are the first report of library Brazilian mayfly identification by DNA barcoding confirming that the COI gene can be an efficient species-specific marker for Ephemeroptera.

We tested and compared these results with several independent datasets to evaluate the utility of genetic distance values derived from DNA sequences as a method of identifying species or species boundaries[7],[9],[21],[22]. In general, COI barcoding has provided an excellent tool for the identification in species level, both in our findings and in the literature, and provide rapid and accurate species identification based on the standard analysis of a short genomic region to produce species tags [3],[11],[12],[14],[23]. We confirmed the validity and effectiveness of the COI-DNA barcode for genetic distance-based species identification of mayfly samples from Brazil. This methodology discovered that taxa of Ephemeroptera identified by morphological analyses often possess levels of sequence divergences that are high values of other pairwise comparisons of the same species. Therefore, the greatest efficacy of a reference barcode library and genetic dissimilarity must be known by applying sequence-divergence values as an easy method in the association of clade of interest and questions for further investigation.

A promising future

Our results reveal that DNA barcoding will permit reduce the unambiguous identification of the vast majority of mayflies species. We now propose to extend our investigation to all Brazilian and all Neotropical region mayfly species. In the longer term, it is wanted that broader collaborations together with nuclear markers, will allow a better understand the phylogenetic relationships between Baetidae, Leptohyphidae, Leptophlebiidae and Oligoneuriidae. Furthermore, the associations between nymphs and adults will be facilitated, and cases of supposedly distinct species (such as those that still have some unknown life stage), when compared and present identical COI sequences, suggest a better decision-making for the association between nymphs and adult stages. In the future we expect that the Ephemeroptera barcode library will help anyone with access to a DNA sequencer help to identify eggs, larva or adult specimens. This will be an invaluable tool for aquatic insect managers, freshwater ecologists and water quality researchers.

Acknowledgments

We would like to thank the IEMA (Instituto Estadual do Meio Ambiente, State of Espírito Santo), ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) and IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis) for the collection authorization (process n.º 11239- 1, 16719-1 and 12777-1). This study was partially funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for TBA (process 88882.385175 / 2019-01) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) (process n.º 61938408)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TBA, RB, FCM, MM, JSP, MPR, PS. Performed the experiments: TBA, RP, RB, FCM, MM, JSP, MPR, PS. Contributed reagents/materials/analysis tools: RP, FFS and DMT Analyzed the data: TBA and RP. Contributed to the writing of the manuscript: TBA, RP and FFS.

References

1. Flowers, RW. Life was a beach: a panbiogeographic analysis of the cosmopolitan mayfly genus Choroterpes (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae). 2009. pp. 585–593

2. Souto PM, da Silveira LFL, Takiya DM, Salles FF. Cryptic diversity in the mayfly Leptohyphodes inanis (Pictet) (Ephemeroptera: Leptohyphidae) across water basins in Southeastern Brazil. Systematics and Biodiversity. 2021. pp. 1–21. doi:10.1080/14772000.2021.1933248

2. Souto PM, da Silveira LFL, Takiya DM, Salles FF. Cryptic diversity in the mayfly Leptohyphodes inanis (Pictet) (Ephemeroptera: Leptohyphidae) across water basins in Southeastern Brazil. Systematics and Biodiversity. 2021. pp. 1–21. doi:10.1080/14772000.2021.1933248

3. Zhou X, Adamowicz SJ, Jacobus LM, Dewalt RE, Hebert PD. Towards a comprehensive barcode library for arctic life - Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. Front Zool. 2009;6: 30.

4. Lebonah DE, Dileep A, Chandrasekhar K, Sreevani S, Sreedevi B, Pramoda Kumari J. DNA Barcoding on Bacteria: A Review. Advances in Biology. 2014. pp. 1–9. doi:10.1155/2014/541787

33

5. Gwiazdowski RA, Foottit RG, Maw HEL, Hebert PDN. The hemiptera (insecta) of Canada: constructing a reference library of DNA barcodes. PLoS One. 2015;10: e0125635.

 Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103: 968– 971.

7. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biol. 2004;2: e312.

8. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 2001. pp. 1244–1245. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1244

9. Pappalardo AM, Cuttitta A, Sardella A, Musco M, Maggio T, Patti B, et al. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae. Hydrobiologia. 2015. pp. 155–167. doi:10.1007/s10750-014-2161-5

10. Weigand H, Beermann AJ, Čiampor F, Costa FO, Csabai Z, Duarte S, et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gapanalysis and recommendations for future work. Sci Total Environ. 2019;678: 499– 524.

11. Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb JM. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. Journal of the North American Benthological Society. 2005. pp. 508–524. doi:10.1899/04-142.1

12. Cardoni S, Tenchini R, Ficulle I, Piredda R, Simeone MC, Belfiore C. DNA barcode assessment of Mediterranean mayflies (Ephemeroptera), benchmark data for a regional reference library for rapid biomonitoring of freshwaters. Biochemical Systematics and Ecology. 2015. pp. 36–50. doi: 10.1016/j.bse.2015.07.035

34
13. Tenchini R, Cardoni S, Piredda R, Simeone MC, Belfiore C. DNA barcoding and faunistic criteria for a revised taxonomy of Italian Ephemeroptera. The European Zoological Journal. 2018. pp. 253–266. doi:10.1080/24750263.2018.1480732

14. Webb JM, Jacobus LM, Funk DH, Zhou X, Kondratieff B, Geraci CJ, et al. A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: progress and prospects. PLoS One. 2012;7: e38063.

15. Ossa-López PA, Camargo-Mathias MI, Rivera-Páez FA. Andesiops peruvianus (Ephemeroptera: Baetidae): a species complex based on molecular markers and morphology. Hydrobiologia. 2018. pp. 351–364. doi:10.1007/s10750-017-3321-1

 Salles FF, Nascimento JMC, Monjardim M, Paresque R, Hamada N, Dominguez
 Diamantina: An endemic new genus of Neotropical Atalophlebiinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) evidenced by morphological and molecular data.
 Zoologischer Anzeiger. 2020. pp. 30–42. doi: 10.1016/j.jcz.2019.10.005

17. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994;3: 294–299.

18. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25: 1451–1452.

19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30: 2725–2729.

20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980;16: 111–120.

21. Bradley RD, Baker RJ. A TEST OF THE GENETIC SPECIES CONCEPT: CYTOCHROME-bSEQUENCES AND MAMMALS. Journal of Mammalogy. 2001; 960– 973. doi:10.1644/1545-1542(2001)082<0960: atotgs>2.0.co;2

22. Spelda J, Reip HS, Oliveira-Biener U, Melzer RR. Barcoding Fauna Bavarica: Myriapoda - a contribution to DNA sequence-based identifications of centipedes and millipedes (Chilopoda, Diplopoda). Zookeys. 2011; 123–139.

23. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci. 2003;270 Suppl 1: S96–9. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 2013; 2725-2729.

Supporting Information

S1 Table. Details of Ephemeroptera specimens used for DNA barcoding and analysis. The table comprises species name, voucher IDs, collection details of specimen

(locality, state and GPS coordinates), and GenBank accession numbers.

Voucher Families	Family name	Species nome	Spacias nama Stata	Logality	GPS coordinates		GenBank
IDs	Family name	species name	State	Locality	Latitude	Longitude	accessions
Ep2761 a	Baetidae	Adebrotus lugoi	Espírito Santo	Sooretama, REBIO Sooretama, Córrego Rodrigues	-19.02680	-40.22750	To be deposited
Ep2762 b	Baetidae	Adebrotus lugoi	Espírito Santo	Sooretama, REBIO Sooretama, Córrego Rodrigues	-19.02680	-40.22750	To be deposited
Ep2505 a	Baetidae	Americabaetis alphus	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-21.11490	-41.69190	To be deposited
Ep2505 b	Baetidae	Americabaetis alphus	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-21.11490	-41.69190	To be deposited
Ep2601	Baetidae	Americabaetis longetron	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá, Cachoeira Ilha Berger	-20.05760	-40.77360	To be deposited
Ep2606 a	Baetidae	Americabaetis longetron	Espírito Santo	Rio Novo do Sul Cachoeira Venezuela	-20.81090	-40.89670	To be deposited
Ep2606 b	Baetidae	Americabaetis longetron	Espírito Santo	Rio Novo do Sul Cachoeira Venezuela	-20.81090	-40.89670	To be deposited
Ep2590 a	Baetidae	Americabaetis titthion	Minas Gerais	Alto Caparaó PARNA Caparaó, Vale Encantado	-20.41080	-41.83430	To be deposited
Ep2590 b	Baetidae	Americabaetis titthion	Minas Gerais	Alto Caparaó PARNA Caparaó, Vale Encantado	-20.41080	-41.83430	To be deposited
Ер2635 с	Baetidae	Aturbina beatrixae	Espírito Santo	Serra, BR 101, Ponte do Bagaço	-20.05940	-40.37850	To be deposited
Ep2635 d	Baetidae	Aturbina beatrixae	Espírito Santo	Serra, BR 101, Ponte do Bagaço	-20.05940	-40.37850	To be deposited
Ep3579 a	Baetidae	Callibaetis pollens	Espírito Santo	São Gabriel da Palha, Parque da Ilha, Rio São José	-19.04810	-40.59330	To be deposited
Ер3579 с	Baetidae	Callibaetis pollens	Espírito Santo	São Gabriel da Palha, Parque da Ilha, Rio São José	-19.04810	-40.59330	To be deposited
Ep3579 d	Baetidae	Callibaetis pollens	Espírito Santo	São Gabriel da Palha, Parque da Ilha, Rio São José	-19.04810	-40.59330	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius billi	Roraima	São joão da Baliza, ramal 27, sitío do igarapé Lajinha	0.949480	-59.91150	To be deposited
Ep3292 a	Baetidae	Camelobaetidius francischetti	Espírito Santo	Laranja da Terra, Cachoeira Criminosa	-19.81680	-41.01200	To be deposited
Ep3292 b	Baetidae	Camelobaetidius francischetti	Espírito Santo	Laranja da Terra, Cachoeira Criminosa	-19.81680	-41.01200	To be deposited
Ep3293 a	Baetidae	Camelobaetidius francischetti	Espírito Santo	Alfredo Chaves Cachoeira Águas de Pinon	-20.54970	-40.85520	To be deposited
Ep3293 b	Baetidae	Camelobaetidius francischetti	Espírito Santo	Alfredo Chaves Cachoeira Águas de Pinon	-20.54970	-40.85520	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius francischettii	Espírito Santo	Alfredo Chaves, Nova Mantova	-20.66158	-40.84008	To be deposited

Voucher Family		Species name	State	Locality	GPS coo	GenBank	
IDs	name	species name	State	Locality	Latitude	Longitude	accessions
-	Baetidae	Camelobaetidius lassance	Bahia	Balneário do Otton	-	-	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius leentvaari	Amapá	Oiapoque, Rio Oiapoque, Cachoeira Alta	3.824720	-51.81806	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius matilei	Roraima	Caroebe, Vicinal 05, Igarapé Jacaré	0.895830	-59.69500	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius ortizi	Roraima	Caracaraí, Balneário Bem Querer	1.930080	-61.00256	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius phaedrus	Santa Catarina	Rio Leão	-27.28330	-51.53330	To be deposited
Ep3109 a	Baetidae	Camelobaetidius rufiventris	Espírito Santo	Santa Teresa, Córrego na subida de Fundão para Santa Teresa	-19.93700	-40.47890	To be deposited
Ep3109 b	Baetidae	Camelobaetidius rufiventris	Espírito Santo	Santa Teresa, Córrego na subida de Fundão para Santa Teresa	-19.93700	-40.47890	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius rufiventris	Espírito Santo	Alfredo Chaves, Nova Mantova	-20.66158	-40.84008	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius tepequensis	Roraima	Amajari, Serra do Tepequem, Igarapé do Barata	3.653100	-61.37150	To be deposited
-	Baetidae	Camelobaetidius tuberosus	Rio Grande do Sul	Bossoroca	-28.71403	-54.89500	To be deposited
Ep2738-Ca3	Baetidae	Cloeodes aymore	ES	Ibitirama, PARNA Caparaó, Rio Pedra Roxa e Afluente, sede do Ibama	-20.39669	-41.73558	To be deposited
Ep2738-Ca4	Baetidae	Cloeodes aymore	ES	Ibitirama, PARNA Caparaó, Rio Pedra Roxa e Afluente, sede do Ibama	-20.39669	-41.73558	To be deposited
Ep2738-Ca5	Baetidae	Cloeodes aymore	ES	Ibitirama, PARNA Caparaó, Rio Pedra Roxa e Afluente, sede do Ibama	-20.39669	-41.73558	To be deposited
Ep2738-Ca6	Baetidae	Cloeodes aymore	ES	Ibitirama, PARNA Caparaó, Rio Pedra Roxa e Afluente, sede do Ibama	-20.39669	-41.73558	To be deposited
Ep2738-Ca7	Baetidae	Cloeodes aymore	ES	Ibitirama, PARNA Caparaó, Rio Pedra Roxa e Afluente, sede do Ibama	-20.39669	-41.73558	To be deposited
Ep2710-Ci1	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited
Ep2710-Ci2	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited
Ep2710-Ci4	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited
Ep2710-Ci5	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited
Ep2710-Ci6	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited
Ep2710-Ci7	Baetidae	Cloeodes itajara	MG	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Verde	-20.41989	-41.84603	To be deposited

Voucher	Family name	Species name	State	Locality	GPS coordinates		GenBank
IDs	raininy name	species name	State	Locanty	Latitude	Longitude	accessions
Ep2700-Ch1	Baetidae	Cloeodes hydation	MG	Alto Caparaó, Vale Encantado	-20.41075	-41.83433	To be deposited
Ep2700	Baetidae	Cloeodes hydation	MG	Alto Caparaó, Vale Encantado	-20.41075	-41.83433	To be deposited
Cl 1	Baetidae	Cloeodes jaragua	-		-	-	To be deposited
Cl 2	Baetidae	Cloeodes jaragua	-	-	-	-	To be deposited
-	Baetidae	Corinnella thomasi	Iata	Rio Madeira		-	To be deposited
-	Baetidae	Harpagobaetis gulosus	Roraima	Cantá, Ponte do rio Cachorro	2.608460	-60.59610	To be deposited
Ep2935 a	Baetidae	Paracloeodes eurybranchus	Espírito Santo	Guaçuí, São Tiago, Cachoeira do Carlito	-20.69890	-41.63540	To be deposited
Ep2935 b	Baetidae	Paracloeodes eurybranchus	Espírito Santo	Guaçuí, São Tiago, Cachoeira do Carlito	-20.69890	-41.63540	To be deposited
Ер2935 с	Baetidae	Paracloeodes eurybranchus	Espírito Santo	Guaçuí, São Tiago, Cachoeira do Carlito	-20.69890	-41.63540	To be deposited
Ep2935 d	Baetidae	Paracloeodes eurybranchus	Espírito Santo	Guaçuí, São Tiago, Cachoeira do Carlito	-20.69890	-41.63540	To be deposited
Ep2769 b	Baetidae	Tupiara ibirapitanga	Minas Gerais	Alto Caparaó PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Cachoeira da Farofa	-20.47210	-41.82830	To be deposited
Ер2769 с	Baetidae	Tupiara ibirapitanga	Minas Gerais	Alto Caparaó PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Cachoeira da Farofa	-20.47210	-41.82830	To be deposited
-	Baetidae	Waltzoyphius roberti	Amazonas	Manaus, Br. 174, Igarapé do Km. 18.5	-2.03435	-60.02590	To be deposited
Ep3422 b	Baetidae	Zelusia deceptiva	Espírito Santo	Santa Teresa, Córrego na subida de Fundão para Santa Teresa	-19.93700	-40.47890	To be deposited
Ep3407 a	Baetidae	Zelusia deceptiva	Espírito Santo	Iúna, Bar Hidrolândia, Rio Brás	-20.32380	-41.81260	To be deposited
Ep3407 b	Baetidae	Zelusia deceptiva	Espírito Santo	Iúna, Bar Hidrolândia, Rio Brás	-20.32380	-41.81260	To be deposited
ENT2324	Leptohyphidae	Amanahyphes bahiensis	Bahia	Barreiras, Boa Esperança, Rio Grande, Valda, 15.iii.2014, L Lima leg.	-12.14830	-44.99250	To be deposited
ENT2559	Leptohyphidae	Leptohyphodes inanis	Rio de Janeiro	Itatiaia, P. N. do Itatiaia, Córrego Maromba, abaixo da cachoeira Véu da Noiva,	-22.42738	-44.61930	To be deposited
ENT2047	Leptohyphidae	Leptohyphes plaumanni	Minas Gerais	Alto Caparaó, Parque Nacional do Caparaó, Vale Verde, Riacho de 2a ordem afluente do rio Caparaó,	-20.41930	-41.84650	To be deposited
ENT1732	Leptohyphidae	Macunahyphes australis	Espírito Santo	Nova Venécia, Casa da Dona Ana, Rio Cricaré (Braço sul do rio São Mateus)	-18.71530	-40.37590	To be deposited
ENT2863	Leptohyphidae	Macunahyphes eduardoi	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pipinuk, Rio Cricaré (Braço sul do rio São Mateus),	-18.66420	-40.51247	To be deposited

Voucher	Family name Snecies name State Locality		GPS coordinates		GenBank		
IDs	Tunny nume	Species nume	State	Dotuity	Latitude	Longitude	accessions
ENT2059	Leptohyphidae	Macunahyphes sp. n1	Amazonas	Barcelos, Comunidade Ucuqui, Rio Jauari,	-0.80007	-63.48970	To be deposited
ENT1720	Leptohyphidae	Traverhyphes (M.) yuatti	Rio de Janeiro	Paraty, Sertão do Taquari, 12.x.2012, PM Souto leg.	-26.21670	-44.71800	To be deposited
ENT2239	Leptohyphidae	Tricorythodes gibbus	Espírito Santo	Santa Teresa, Córrego na subida de Fundão, 30.vii.2012,	-19.93700	-40.47890	To be deposited
ENT1733	Leptohyphidae	Tricorythodes hiemalis	Espírito Santo	Guaçuí, São Tiago, Cachoeira do Carlito,	-20.69890	-41.63530	To be deposited
ENT1721	Leptohyphidae	Tricorythodes mirca	Pernambuco	São João, Riacho da Barragem Inhumas,	-8.971400	-36.36340	To be deposited
ENT2238	Leptohyphidae	Tricorythodes sallesi	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pipinuk,	-18.66420	-40.51247	To be deposited
ENT2055	Leptohyphidae	Tricorythodes santarita	Espírito Santo	Santa Teresa, Córrego na subida de Fundão para Santa Teresa,	-19.93700	-40.47891	To be deposited
ENT1734	Leptohyphidae	Tricorythodes yura	Espírito Santo	Alfredo Chaves, Cachoeira Águas de Pinon,	-20.54960	-40.85520	To be deposited
ENT1837	Leptohyphidae	Tricorythopsis chiriguano	Pernambuco	Jaqueira, Rio Pirangi, PE-126 próximo a ponte,	-8.748050	-35.81410	To be deposited
ENT2044	Leptohyphidae	Tricorythopsis rondoniensis	Amazonas	AM 240, km 12, Santuário, 30. viii. 2010	-2.034350	-60.02590	To be deposited
ENT1722	Leptohyphidae	Tricorythopsis spongicola	Pernambuco	Amaraji, Rio Amaraji, próximo a usina,	-8.363500	-35.48020	To be deposited
Ep3996b	Leptophlebiidae	Askola froehlichi	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Cachoeira da Farofa	-20.47208	-41.82825	To be deposited
Ep3998a	Leptophlebiidae	Askola froehlichi	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Cachoeira da Farofa	-20.47208	-41.82825	To be deposited
Ep5510a	Leptophlebiidae	Askola sp.	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Sete Pilões	-20.48250	-41.83070	To be deposited
Ep5510b	Leptophlebiidae	Askola sp.	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Rio São Domingos, Sete Pilões	-20.48250	-41.83070	To be deposited
Ep3804 a	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	Santa Teresa, Rio 5 de novembro, primeira ponte	-19.88020	-40.61070	To be deposited
Ep3804 b	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	Santa Teresa, Rio 5 de novembro, primeira ponte	-19.88020	-40.61070	To be deposited
Ep3809 a	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	São Roque do Canaã, Rio Santa Maria do Rio Doce, Cachoeira São Pedro	-19.71110	-40.66170	To be deposited
Ep3809 b	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	São Roque do Canaã, Rio Santa Maria do Rio Doce, Cachoeira São Pedro	-19.71110	-40.66170	To be deposited
Ep3802 a	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-21.11480	-41.69190	To be deposited
Ep3802 b	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-21.11480	-41.69190	To be deposited
Ep3688	Leptophlebiidae	Farrodes carioca	Espírito Santo	Ecoporanga, Cachoeira 2 de setembro	-18.34886	-40.87317	To be deposited
Ep5607	Leptophlebiidae	Hydromastodon sallesi	Roraima	Boa Vista, Cauamé	2.868140	-60.74039	To be deposited

Voucher	Family name	Species name	State	Locality		rdinates	GenBank
IDs				20041109	Latitude	Longitude	accessions
Ep4014	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon gilliesae	Espírito Santo	Serra, BR 101, Ponte do Bagaço	-20.54969	-40.85522	To be deposited
Ep4015	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon gilliesae	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-18.92672	-40.84033	To be deposited
Ep6100	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon gilliesae	Espírito Santo	Iuna	-20.35170	-41.53280	To be deposited
Ep5754	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon plagatus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5759	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon plagatus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5862	Leptophlebiidae	Hydrosmilodon plagatus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep4319	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	São Gabriel da Palha, Parque da Ilha, Rio São José	-19.04808	-40.59325	To be deposited
Ep4324	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5614	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5616	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	São Gabriel da Palha, Parque da Ilha, Rio São José	-19.04808	-40.59325	To be deposited
Ep5752	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5758	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5868	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep5873	Leptophlebiidae	Hylister obliquus	Espírito Santo	Nova Venécia, Rio Cotaxé, Patrimônio do Bis	-18.55764	-40.33514	To be deposited
Ep4307	Leptophlebiidae	Hylister plaumanni	Espírito Santo	Santa Leopoldina, Rio que passa na estrada para Hospedaria Pau a Pique	-20.12681	-40.55100	To be deposited
Ep4270	Leptophlebiidae	Hylister plaumanni	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá, Cachoeira Ilha Berger	-20.05760	-40.77360	To be deposited
Ep1797 b	Leptophlebiidae	Massartella brieni	Espírito Santo	Domingos Martins, Peçanha, Cachoeira Peçanha	-20.31539	-41.05558	To be deposited
Ep1459	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep5760	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep6085	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Rondônia	Nova Lonva Londrina, Rio Urupá	-8.761830	-63.90200	To be deposited
Ep6086	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Roraima	Bomfim, Rio Arraia	3.351110	-68.08708	To be deposited
Ep6093	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Roraima		2.819540	-60.67140	To be deposited
Ep6117	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Amapá	Rio Amapá Grande (Cachoeira)	2.162140	-51.67867	To be deposited
Ep5761	Leptophlebiidae	Leentvaaria palpalis	Roraima	Bomfim, Rio Arraia	3.351110	-68.08708	To be deposited
Ep4803 a	Leptophlebiidae	Massartella brieni	Espírito Santo	Santa Teresa, REBIO Augusto Ruschi, ER1	-19.85392	-40.56058	To be deposited

Voucher	Family name	Spacios namo	State	Locality	GPS coo	GenBank	
IDs	Failing name	species name	State	Locanty	Latitude	Longitude	accessions
Ep4803 b	Leptophlebiidae	Massartella brieni	Espírito Santo	Santa Teresa, REBIO Augusto Ruschi, ER1	-19.85392	-40.56058	To be deposited
Ep3666a	Leptophlebiidae	Miroculis caparaoensis	Minas Gerais	Espera Feliz, PARNA Caparaó, Pedra Menina	-20.62508	-41.82419	To be deposited
Ep3666b	Leptophlebiidae	Miroculis caparaoensis	Minas Gerais	Espera Feliz, PARNA Caparaó, Pedra Menina	-20.62508	-41.82419	To be deposited
Ep5501a	Leptophlebiidae	Miroculis caparaoensis	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Encantado		-41.83433	To be deposited
Ep5501b	Leptophlebiidae	Miroculis caparaoensis	Minas Gerais	Alto Caparaó, PARNA Caparaó, Vale Encantado	-20.41075	-41.83433	To be deposited
Ep3658a	Leptophlebiidae	Miroculis fittkaui	Espírito Santo	Alfredo Chaves, Cachoeira Águas de Pinon	-20.54969	-40.85522	To be deposited
Ep3659a	Leptophlebiidae	Miroculis fittkaui	Espírito Santo	Iúna, Bar Hidrolândia, Rio Brás	-20.32378	-41.81264	To be deposited
Ep-6098	Leptophlebiidae	Needhamella ehrharti	Amapá	Igarapé Davi Grande	1.931530	-50.86056	To be deposited
Ep-5745	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Rondônia	Ribeirão, Rio Mamoré, 48Km de Guajará Mirim	-10.23192	-65.28578	To be deposited
Ep-5746	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	Igarapé Tartarugalzinho	1.765470	-50.87783	To be deposited
Ep-5747	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Bahia	Rio Rio de Janeiro, Ponte (ps: 17A: Acima do Cachoeira Acaba Vida)	-11.89828	-45.61086	To be deposited
Ep-5748	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	Oiapoque, Cachoeira Marripá	3.802110	-51.87550	To be deposited
Ep-5749	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Rondônia	Igarapé primeira ponte depois do Rio Preto (2km) – Candeias	-8.897110	-63.64164	To be deposited
Ep-6070	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	-	2.051080	-50.79450	To be deposited
Ep-6071	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	-	2.051080	-50.79450	To be deposited
Ep-6072	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	-	2.051080	-50.79450	To be deposited
Ep-6099	Leptophlebiidae	Paramaka convexa	Amapá	Rio Amapá Grande (Cachoeira)	2.162140	-51.67867	To be deposited
Ep6726 a	Leptophlebiidae	Perissophlebiodes sp.	Minas Gerais	Conceição do Mato dentro, Peixe Tolo	-19.04200	-43.41770	To be deposited
Ep6726 b	Leptophlebiidae	Perissophlebiodes sp.	Minas Gerais	Conceição do Mato dentro, Peixe Tolo	-19.04200	-43.41770	To be deposited
Ер6726 с	Leptophlebiidae	Perissophlebiodes sp.	Minas Gerais	Conceição do Mato dentro, Peixe Tolo	-19.04200	-43.41770	To be deposited
Ep6726 d	Leptophlebiidae	Perissophlebiodes sp.	Minas Gerais	Conceição do Mato dentro, Peixe Tolo	-19.04200	-43.41770	To be deposited
Ep- 6560b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Minas Gerais	Parque Nacional da Serra do Cipó, Córrego das Pedras	-19.20470	-43.60060	To be deposited
Ep- 6562a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Rio Grande	-12.91996	-41.94406	To be deposited
Ep- 6562b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Rio Grande	-12.91996	-41.94406	To be deposited
Ep- 6562c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Rio Grande	-12.91996	-41.94406	To be deposited

Voucher	Family name	Species name	State	Locality	GPS coordinates		GenBank
IDs	Failing name	species name	State	Locanty	Latitude	Longitude	accessions
Ep- 6563a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Riachinho	-12.95631	-41.86276	To be deposited
Ep- 6563b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Riachinho	-12.95631	-41.86276	To be deposited
Ep- 6563c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Riachinho	-12.95631	-41.86276	To be deposited
Ep- 6564a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Espírito Santo	Sooretama, São José		-40.24058	To be deposited
Ep- 6564b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Espírito Santo	Sooretama, São José	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep- 6564c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Espírito Santo	Sooretama, São José	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep- 6565a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Espírito Santo	Sooretama, São José	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep- 6566a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Rio do Morro Branco	-19.65383	-41.48731	To be deposited
Ep- 6566c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina, Vale do Capão, Rio do Morro Branco	-19.65383	-41.48731	To be deposited
Ep- 6567a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina/Lençóis, Rio Mucugezinho	-12.46167	-41.41739	To be deposited
Ep- 6567b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina/Lençóis, Rio Mucugezinho	-12.46167	-41.41739	To be deposited
Ep- 6567c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Bahia	Chapada Diamantina/Lençóis, Rio Mucugezinho	-12.46167	-41.41739	To be deposited
Ep- 6569b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis diamantinensis	Espírito Santo	Nova Venécia, Pipnuck	-18.66428	-40.51247	To be deposited
Ep-4340	Leptophlebiidae	Simothraulopsis plesius	Espírito Santo	Bom Jesus do Norte, Ilha do Vicente, Rio Itabapoana	-21.11489	-41.69192	To be deposited
Ep-4342	Leptophlebiidae	Simothraulopsis plesius	Espírito Santo	Sooretama, Rebio Sooretama, Córrego Rodrigues	-19.02683	-40.22750	To be deposited
Ep-4344	Leptophlebiidae	Simothraulopsis plesius	Espírito Santo	Sooretama, Rebio Sooretama, Córrego Rodrigues	-19.02683	-40.22750	To be deposited
Ep-6350	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Linhares, Lagoa Palminhas	-19.39080	-40.07140	To be deposited
Ep- 971a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5971b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5972a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5972b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5972c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5972d	Leptophlebiidae	Simothraulopsis caliginosus	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited

Voucher Family name		Gracias nome	State	Lagality	GPS coordinates		GenBank
IDs	Family name	Species name	State	Locality	Latitude	Longitude	accessions
Ep- 5972e	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 2	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr. Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep- 6032a	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 2	Espírito Santo	Nova Venécia, Entrada da cidade, Casa da Dona Ana e Seu Adalto, Rio Cricaré	-18.71530	-40.37590	To be deposited
Ep- 6034	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 2	Espírito Santo	Nova Venécia, Entrada da cidade, Casa da Dona Ana e Seu Adalto, Rio Cricaré	-18.71530	-40.37590	To be deposited
Ep- 6041	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 2	Espírito Santo	São Mateus, Fazenda Liberdade, Rio Cricaré	-18.65061	-40.12317	To be deposited
Ep- 6565b	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 4	Espírito Santo	Sooretama, São José	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep- 6565c	Leptophlebiidae	Simothraulopsis sp. nov. 4	Espírito Santo	Sooretama, São José	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep-4017	Leptophlebiidae	Traverella insolita	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5756	Leptophlebiidae	Traverella insolita	Espírito Santo	Sooretama, Rio São Jose	-19.12586	-40.24058	To be deposited
Ep-5866	Leptophlebiidae	Traverella insolita	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5871	Leptophlebiidae	Traverella insolita	Espírito Santo	Nova Venécia, Santa Rita do Pip Nuck, Casa do Sr Pupim, Rio Cricaré	-18.66430	-40.51250	To be deposited
Ep-5881	Leptophlebiidae	Traverella insolita	Espírito Santo	São Mateus, Propriedade do Sr. Fábio Gama, Rio Cotaxé	-18.62808	-40.11156	To be deposited
Ep 5728 b	Leptophlebiidae	Ulmeritoides cf. uruguaiensis	Espírito Santo	São Mateus, Propriedade do Sr. Fábio Gama, Rio Cotaxé	-18.62808	-40.11156	To be deposited
Ер 5728 с	Leptophlebiidae	Ulmeritoides cf. uruguaiensis	Espírito Santo	São Mateus, Propriedade do Sr. Fábio Gama, Rio Cotaxé	-18.62808	-40.11156	To be deposited
Ep 5729 a	Leptophlebiidae	Ulmeritus saopaulensis	Minas Gerais	Paula Candido, Lagoa	-20.87480	-42.96980	To be deposited
Ep 5729 b	Leptophlebiidae	Ulmeritus saopaulensis	Minas Gerais	Paula Candido, Lagoa	-20.87480	-42.96980	To be deposited
Ep 5730 a	Leptophlebiidae	Ulmeritus saopaulensis	Minas Gerais	Paula Candido, Lagoa	-20.87480	-42.96980	To be deposited
Ep 5730 b	Leptophlebiidae	Ulmeritus saopaulensis	Minas Gerais	Paula Candido, Lagoa	-20.87480	-42.96980	To be deposited
Ep-6387b	Oligoneuriidae	Fittkauneuria adusta	Roraima	Pacaraima, Igarapé Miangui	4.417010	-61.14080	KU609048
Ep-6387A	Oligoneuriidae	Fittkauneuria adusta	Roraima	Pacaraima, Igarapé Miangui	4.417010	-61.14080	To be deposited
Ep-6387C	Oligoneuriidae	Fittkauneuria adusta	Roraima	Pacaraima, Igarapé Miangui	4.417010	-61.14080	To be deposited

Voucher Family name		Spacios namo	State	Locality	GPS coordinates		GenBank
IDs	Failing name	species name	State	Locality	Latitude	Longitude	accessions
Ep-5664A	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14308	-41.15056	To be deposited
Ep-5664B	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14308	-41.15056	To be deposited
Ep-5664C	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14308	-41.15056	To be deposited
Ep-5664D	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	o Santo Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil -2		-41.15056	To be deposited
Ep-5664E	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14308	-41.15056	To be deposited
Ep-5664F	Oligoneuriidae	Homoeoneuria watu	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14308	-41.15056	To be deposited
Ep-5632a	Oligoneuriidae	Lachlania alcidesi	Espírito Santo	Sooretama, Rio São José	-19.12586	-40.24058	KU609049
Ep-5632b	Oligoneuriidae	Lachlania alcidesi	Espírito Santo	Sooretama, Rio São José	-19.12586	-40.24058	KU609050
Ep-5632c	Oligoneuriidae	Lachlania alcidesi	Espírito Santo	Sooretama, Rio São José		-40.24058	KU609051
Ep-5632d	Oligoneuriidae	Lachlania alcidesi	Espírito Santo	Sooretama, Rio São José		-40.24058	To be deposited
Ep-4006a	Oligoneuriidae	Lachlania aldinae	Piauí	Rio Longa, Barras	-4.249480	-42.29460	KU609052
Ep-5628a	Oligoneuriidae	Lachlania aldinae	Piauí	Rio Longa, Barras	-4.249480	-42.29460	KU609053
Ep-5628b	Oligoneuriidae	Lachlania aldinae	Piauí	Rio Longa, Barras	-4.249480	-42.29460	KU609054
Ep-5628c	Oligoneuriidae	Lachlania aldinae	Piauí	Rio Longa, Barras	-4.249480	-42.29460	KU609055
Ep-2000a	Oligoneuriidae	Lachlania aldinae	Amapá	Serra do Navio, Rio Cachaço	0.866870	-52.02580	KU609056
Ep-5641a	Oligoneuriidae	Lachlania sp.1	Amapá	Serra do Navio, Rio Cachaço	0.866870	-52.02580	KU609057
Ep-5641b	Oligoneuriidae	Lachlania sp.1	Amapá	Serra do Navio, Rio Cachaço	0.866870	-52.02580	KU609058
Ep-2391b	Oligoneuriidae	Lachlania sp.2	Amapá	Serra do Navio, Rio Cachaço	0.866870	-52.02580	KU609059
Ep-4004a	Oligoneuriidae	Lachlania sp.3	Rio de Janeiro	Macaé, Rio Macaé	-22.37170	-41.78570	KU609060
Ep-5626a	Oligoneuriidae	Lachlania sp.4	Amazonas	Barcelos, Igarapé Jauarí	-0.800080	-63.48970	KU609061
Ep5626b	Oligoneuriidae	Lachlania sp.4	Amazonas	Barcelos, Igarapé Jauarí	-0.800080	-63.48970	KU609062
Ep5626c	Oligoneuriidae	Lachlania sp.4	Amazonas	Barcelos, Rio Jauarí	-0.800080	-63.48970	KU609063

Voucher _{Fa}	Family name	Spacing name	State	Locality	GPS coordinates		GenBank
IDs	Family name	species name	State	Locality	Latitude	Longitude	accessions
EP-5666A	Oligoneuriidae	Oligoneuria amandae	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14961	-41.15092	KT201522
EP-5682A	Oligoneuriidae	Oligoneuria amandae	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14961	-41.15092	KT201523
Ep5624a	Oligoneuriidae	Lachlania sp.5	Amazonas	Barcelos, Sr. Miranda	-0.800080	-63.48970	KU609064
Ep5624c	Oligoneuriidae	Lachlania sp.5	Amazonas	Barcelos, Rio Demeni	-0.975280	-62.92444	KU609065
Ep5639a	Oligoneuriidae	Lachlania sp.6	Amazonas	Barcelos, Rio Aracá	-0.409410	-63.38810	KU609066
Ep5639b	Oligoneuriidae	Lachlania sp.6	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14961	-41.15092	KU609067
Ep5639c	Oligoneuriidae	Lachlania sp.6	Espírito Santo	Afonso Cláudio, Cachoeira do Funil	-20.14961	-41.15092	KU609068
EP-5665B	Oligoneuriidae	Oligoneuria amandae	Espírito Santo	Pancas, Cachoeira do Gilles	-19.05069	-40.87442	KT201521
EP-5665A	Oligoneuriidae	Oligoneuria amandae	Espírito Santo	Pancas, Cachoeira do Gilles	-19.05069	-40.87442	KT201520
EP-6054D	Oligoneuriidae	Oligoneuria amazonica	Espírito Santo	Pancas, Cachoeira do Gilles	-19.05069	-40.87442	KT201517
EP-6054C	Oligoneuriidae	Oligoneuria amazonica	Espírito Santo	Pancas, Cachoeira do Gilles	-19.05069	-40.87442	KT201516
EP-6054B	Oligoneuriidae	Oligoneuria amazonica	Espírito Santo	Pancas, Cachoeira do Gilles	-19.05069	-40.87442	KT201515
EP-6054A	Oligoneuriidae	Oligoneuria amazonica	Bahia	Correntina, Rio Arrojado	-13.51933	-45.35050	KT201514
EP-6057C	Oligoneuriidae	Oligoneuria anatina	Bahia	Correntina, Rio Arrojado	-13.51933	-45.35050	KR052443
EP-6057A	Oligoneuriidae	Oligoneuria anatina	São Paulo	PARNA Serra da Bocaina	-23.33333	-44.90000	KR052442
EP-6051A	Oligoneuriidae	Oligoneuria anatina	Espírito Santo	Alfredo Chaves, Águas de Pinon	-20.54969	-40.85522	KR052441
Ep-6057B	Oligoneuriidae	Oligoneuria anatina	Tocantins	Lajeado do Tocantins, Rio Tocantins	-9.751390	-48.35856	To be deposited
630P-C	Oligoneuriidae	Oligoneuria macabaiba	Tocantins	Lajeado do Tocantins, Rio Tocantins	-9.751390	-48.35856	To be deposited
EP-5668C	Oligoneuriidae	Oligoneuria mitra	Tocantins	Lajeado do Tocantins, Rio Tocantins	-9.751390	-48.35856	KT201519
EP-5668B	Oligoneuriidae	Oligoneuria mitra	Goiás	Mineiros	-17.46656	-52.46078	KT201518
Ep-5710A	Oligoneuriidae	Oligoneuria mitra	Goiás	Mineiros	-17.46656	-52.46078	To be deposited
Ep-5712A	Oligoneuriidae	Oligoneuria mitra	Goiás	Simolândia e Jaciara, Rio da Prata	-14.47167	-46.48639	To be deposited
Ep-5715A	Oligoneuriidae	Oligoneuria truncata	Goiás	Simolândia e Jaciara, Rio da Prata	-14.47167	-46.48639	To be deposited
Ep-5667B	Oligoneuriidae	Oligoneuria truncata	Goiás	Simolândia e Jaciara, Rio da Prata	-14.47167	-46.48639	To be deposited

S2 Table. Sequence-divergence values for intraspecific, interspecific and intergeneric comparisons. Values were calculated using a Kimura 2-parameter model of evolution for all the four families.

(XLS)

CAPÍTULO 2: Desvendando a diversidade e evolução das asas de Hagenulinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae)

Desvendando a diversidade e evolução das asas de Hagenulinae (Ephemeroptera: Leptophlebiidae)

A ser submetido na revista: Journal of Zoological Systematics and Evolutionary

Research (FI:2.159, Qualis: A2)

Taís Barbosa Almeida¹, F.F. Salles^{1,2} & R. Paresque^{1,3}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

² Museu de Entomologia, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa,
36570-900, Minas Gerais, Brazil

³ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brasil.

Autor correspondente: Taís Barbosa Almeida, Universidade Federal de Espírito Santo, Vitória, Brasil. E-mail: tais.barbosaa@gmail.com

Palavras-chave: Morfometria Geométrica, Diversidade Morfológica, Asas, Mudanças evolutivas.

Resumo

As asas são uma das estruturas mais importantes na evolução e diversificação dos insetos. A forma da asa e venação estão diretamente ligadas aos princípios aerodinâmicos, custos energéticos do voo, tamanho e relacionamento filogenético das espécies. Para a ordem Ephemeroptera, a estrutura e a forma das asas são extremamente importantes para interpretar as relações taxonômicas. Com o intuito de entender as mudanças evolutivas presentes na forma e tamanho das asas de Hagenulinae, no presente estudo foram investigadas a diversidade morfológica das asas anteriores e posteriores de 130 espécimes pertencentes à quatro subtribos da subfamília Hagenulinae: Hermanellina, Miroculina, Ulmeritina e Hagenulina, a partir da morfometria geométrica. Os resultados revelaram uma alometria significativa para as asas anteriores e posteriores, dessa forma o aumento de tamanho das asas possui influência na forma, especialmente nas regiões basais e apicais da asa. Além disso, as asas posteriores contribuem melhor para a separação das subtribos, indicando que são mais conservadas para o grupo.

Introdução

Como os animais adquiriram a habilidade de voar é uma questão de grande interesse para os biólogos evolucionistas (Ross, 2017). O voo permite que um animal se disperse através de barreiras físicas como montanhas e mares, encontre parceiros sexuais, viva em lugares relativamente seguros e longe de predadores que vivem no solo, e podem ainda, acessar fontes restritas de alimento (Benson & Srygley, 1994; Breuker, Brakefield & Gibbs, 2007; Dockx, 2007; Dudley, 2000; Ellington, 1984; Ross, 2017; Soderquist & Bokma, 2009). Por esses motivos citados anteriormente, as asas são uma das estruturas mais importantes na evolução e diversificação dos insetos (Grimaldi & Engel, 2005). Entretanto, a origem das asas em Pterygota ainda é um assunto controverso e amplamente debatido entre os entomologistas. Alguns estudos sugerem que os lobos paranotais deram origem a estas estruturas, outros propõem que as brânquias tenham relação com a origem das asas, há ainda hipóteses que sugerem uma origem dupla: do tergo e segmentos proximais das pernas do ancestral dos insetos (Almudi et al., 2020; Clark-Hachtel & Tomoyasu, 2020; Kukalová-Peck, 2008; Prokop et al., 2017; Snodgrass, 1935).

A forma das asas dos insetos e o padrão da distribuição das suas veias (venação) estão diretamente relacionadas aos princípios aerodinâmicos, custos energéticos do voo, tamanho e filogenia das espécies (Savage, 1983). Estudos demonstraram, por exemplo, que asas longas e mais estreitas são ideais para voos de longa duração (Betts & Wootton, 1988). Quanto mais longas as asas são, maior é a área que elas ocupam e, portanto, maior é o volume da massa de ar que encontram por unidade de tempo, assim gastam menos energia para o voo (Wootton & Kukalová-Peck, 2000). Por outro lado, as asas curtas e largas são ideais para voos curtos e ágeis (DeVries et al. 2010).

Apesar de instigante, ainda se sabe pouco sobre a estrutura e evolução da forma das asas para a ordem Ephemeroptera. Estudos como os de Edmunds & Traver (1954), Savage (1983), Ruffieux et al. (1998), Wootton & Kukalová (2000) e mais recentemente Dominguez & Abdala (2018) e Pereira-da-Conceicoa et al. (2019) discutiram sobre mecanismos de voo, estrutura e evolução das asas para a ordem. Como Ephemeroptera integra uma das linhagens mais antigas dentre os demais insetos alados (Pterygota), as asas dos seus representantes são estruturas filogeneticamente importantes para determinar às relações entre os táxons, bem como no contexto de classificação taxonômica (Kukalová-Peck, 1991; Kukalová-Peck, 1985; Wootton, 1981). Quando adultos alados, a maioria das estruturas dos efemerópteros são adaptadas para a reprodução (Edmunds & Traver, 1954), e o comportamento de acasalamento e a postura de ovos dependem do voo. Os efemerópteros viventes possuem asas anteriores e posteriores desiguais, sendo a asa posterior muito menor do que a anterior, no entanto, batem em conjunto, de modo que o par de asas atua como um único aerofólio (Wootton & Kukalová-Peck, 2000). Essa redução das asas posteriores é considerada uma sinapomorfia para a linhagem atual de Ephemeroptera (Kluge, 2004). Representantes de efemerópteros do paleozóico eram muito diferentes, as espécies do Permiano inferior, classificadas nas famílias Protereismatidae e Misthodotidae, tinham asas anteriores e posteriores semelhantes em comprimento, forma e venação (Wootton & Kukalová-Peck, 2000, Sroka et al., 2021).

Hagenulinae é uma subfamília de Leptophlebiidae composta exclusivamente por gêneros neotropicais, com poucos gêneros, como Farrodes Peters, 1971; Thraulodes Ulmer, 1920; e *Traverella Edmunds, 1948,* estendendo-se para a América do Norte. Ela está subdividida em duas tribos: Miroculini e Hagenulini (Monjardim et al. 2019). Miroculini possui duas subtribos: Miroculina (composta pela linhagem Miroculis e o gênero Thraulodes) e Hermanellina (inclui os complexos Hermanella e Homothraulus), enquanto Hagenulini é composta por Ulmeritina (inclui os gêneros *Ulmeritus, Ulmeritoides e Diamantina*) e Hagenulina (incluem a super linhagem Hagenulopsis). Estas subtribos possuem, portanto, um grande número de gêneros (Tabela S1) que variam de tamanho, morfologia de suas asas ou até mesmo quanto a presença/ausência de asas posteriores, como por exemplo para os gêneros Askola, Hagenulopsis, Bessierus e Perissophlebiodes, cujas as asas posteriores estão ausentes (Dominguez, 2009). Askola está mais intimamente relacionado com Hagenulopsis, enquanto Perissophlebioides está mais intimamente relacionado a Bessierus; e esses gêneros não constituem um grupo monofilético (Dominguez, 2009; Monjardim et al., 2019). E estas características como a presença ou ausência das asas posteriores, projeções costais das asas posteriores obtusas ou agudas e padrão de venação, como por exemplo: MA e MP simétricas ou assimétricas, Icu ligada à CuA, CuP, a ambos ou livre, veia Sc da asa posterior terminando antes ou depois da projeção costal, são amplamente utilizadas para a taxonomia do grupo (Dominguez, et al., 2006). Tamanha diferença morfológica pode ser encontrada devido aos processos evolutivos que atuaram sob a história de vida desses indivíduos (Line-Medina et al. 2016, Van Valkenburgh, 1999).

Trabalhos anteriores que discutiram características de Hagenulinae foram baseados, principalmente, em levantamentos de caracteres discretos (e.g. Flowers

& Dominguez, 1991; Kluge, 1994; Sartori, 2005; Dominguez, 2009; Dominguez, 2019). Apenas Savage (1983) propôs entender a evolução das asas para uma linhagem deste grupo - o autor estudou *Miroculis* e gêneros relacionados usando dados de morfometria tradicional. Este estudo tratou sobre o efeito do tamanho na forma, a estrutura das asas e as possíveis implicações aerodinâmicas neste grupo. Savage relatou que caracteres do formato de asa, como as relações largura/comprimento da asa anterior e posterior parecem estar mais fortemente correlacionados com o tamanho dessas estruturas e aos princípios aerodinâmicos, do que ao arranjo das veias dentro das asas, que, por sua vez, parecem ser mais fortemente correlacionados com a história filogenética da espécie.

A morfometria geométrica, quando comparada à tradicional, é muito mais eficiente para capturar as informações relacionadas à forma e ao tamanho dos indivíduos, pois apresenta uma robustez estatística muito maior em suas análises (Rohlf & Marcus, 1993). Soma-se a isso que dados utilizados em morfometria geométrica não se baseiam mais em medidas ou ângulos, mas sim em coordenadas cartesianas chamadas "marcos anatômicos", aumentando sua eficiência em capturar a forma dos indivíduos, permitindo identificar onde, como e em que magnitude estão ocorrendo as mudanças na forma (Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). Além disso, a morfometria geométrica permite analisar diferenças na forma e tamanho com objetivos de inferir os mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação das espécies. Podendo, portanto, ser utilizada para a obtenção de hipóteses das relações filogenéticas ou para descrever tendências evolutivas nas filogenias (Smith, 1990).

Embora a forma das asas seja extremamente importante para desvendar os aspectos da evolução dos grupos, apenas o estudo de Pereira-da-Conceicoa et al. (2019)

examinou a variação morfológica das asas de uma família sul-africana (Teloganodidae) empregando a morfometria geométrica, além da filogenética molecular, para determinar a mudança evolutiva da forma das asas do grupo e alometria. Neste estudo o efeito da alometria teve um efeito significativo apenas para a asa anterior e as principais descobertas desta pesquisa mostraram que as relações entre a forma e o tamanho da asa são complexas e específicas do táxon.

Não houve nenhuma análise quantitativa anterior usando uma abordagem morfométrica geométrica para lançar luz sobre a diversidade morfológica e a evolução das asas de Hagenulinae. Portanto, neste estudo avaliamos de forma inédita a variação morfológica na forma da asa de 23 gêneros neotrópicos pertencentes a Hagenulinae a partir da morfometria geométrica, a fim de investigar as mudanças evolutivas presentes na forma e tamanho das asas anteriores e posteriores do grupo. Os planos básicos plesiomórficos das asas das subtribos de Hagenulinae foram reconstruídos, e a evolução das asas do grupo foi inferida e discutida.

Material e métodos

Obtenção e preservação dos espécimes

Foram obtidos um total de 130 indivíduos pertencentes à subfamília Hagenulinae e o gênero *Massartela* Lestage, 1930 (Atalophlebiinae) foi tratado como grupo externo, abrangendo 23 gêneros e 54 espécies (Tabela S2). O material do grupo biológico em questão já se encontrava coletado e tombado na Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC), São Mateus - Brasil, no Museu de Entomologia da

Universidade Federal de Viçosa (UFV), e fotos das asas de *Bessierus* foram cedidas pelo professor Dr. Paulo Vilela Cruz, depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto de Pesquisas Nacional da Amazônia (INPA). As genitálias masculinas e as asas dos espécimes foram preservadas em álcool etílico 96% e posteriormente montados em lâminas permanentes, preparadas com Euparal® para as genitálias e à seco para as asas. As genitálias foram montadas a fim de confirmar as identificações dos espécimes.

Obtenção e análises dos caracteres morfométricos

Análise da variação da forma

Os caracteres foram obtidos a partir de características morfológicas externas das asas anteriores e posteriores dos adultos. Os indivíduos machos foram priorizados para o conjunto de dados, entretanto, na ausência deles foram utilizadas as asas de fêmeas para conseguir cobrir a maior parte dos gêneros alvos do presente estudo.

As fotografias foram obtidas usando um estereomicroscópio Stemi-200C ZEISS com câmera digital Axiocam ERc 5s acoplada, a escala foi fornecida pelo próprio programa de fotografia do equipamento.

Um total de 29 marcos anatômicos foi selecionado para as asas anteriores, e 15 marcos anatômicos para as asas posteriores (Figura 1, Tabela S3). Para a escolha dos marcos anatômicos foram considerados os princípios de homologia proposto por Bookstein (1991), e os marcos anatômicos utilizados por Pereira-da-Conceicoa et al. (2019), adaptando-os às especificidades do grupo alvo deste estudo. Assumiuse a simetria das asas e os marcos anatômicos foram posicionados preferencialmente nas asas direita, quando não foi possível o uso do lado direito, o

lado esquerdo foi utilizado, após espelhamento realizado através do Adobe® Illustrator® CS5. As análises de morfometria geométrica foram conduzidas com os seguintes agrupamentos taxonômicos: Hermanellina, Miroculina, Hagenulina e Ulmeritina (Monjardim et al., 2019).

As análises foram conduzidas no ambiente de programação R e RStudio (R Core Team 2013, RStudio Team 2015), com integração dos pacotes Stereomorph (Olsen & Westnest 2015) e Geomorph (Adams et al. 2020) para obtenção dos marcos anatômicos e das coordenadas em duas dimensões, respectivamente. Cada amostra foi medida duas vezes e a repetibilidade foi estimada para avaliar confiabilidade da medição. O pacote ggplot2 (Wickham 2016) foi utilizado para construção dos elementos gráficos. Com os marcos anatômicos obtidos as coordenadas foram submetidas a Análise Generalizada de Procrustes (GPA) e, através da GPA, foram obtidos o tamanho do centróide (variável de tamanho isolado da forma) as distâncias Procrustes (variáveis de forma isoladas do tamanho) e uma matriz de distância de forma entre os espécimes. Pontos discrepantes foram investigados através das coordenadas procrustes, os espécimes que divergiram da distribuição normal foram checados em relação a erros de digitalização e se continham algum fator de agrupamento em comum, entretanto nenhum espécime continha erro de digitalização e foram mantidos nas análises. A alometria também foi investigada, através dos scores de regressão linear das Distâncias Procrustes sobre o tamanho do log do centróide (Drake & Klingenberg 2008).

Posteriormente, Análises de Componentes Principais (PCA) foram conduzidas utilizando as Coordenadas Procrustes para a visualização do comportamento dos espécimes no morfoespaço. Com os scores obtidos, gráficos de dispersão foram

plotados e o comportamento dos grupos incluídos em cada PCA foi destacado por elipses construídas com intervalo de 95% de confiança. Variações de forma foram visualizadas através de grades de deformação plotadas a partir da forma média em direção aos valores mínimo e máximo contidos em cada Componente Principal (PC).

Em seguida, o tamanho foi investigado através de uma análise de estatísticas descritivas (média e desvio padrão), comparado por gráficos boxplots e de uma Análise de Variância (ANOVA) com valor p \leq 0,05. Além disso, um Teste de Tukey foi conduzido para identificar diferenças entre pares. Diferenças na forma foram investigadas por uma ANOVA de Procrustes com valor p \leq 0,05 e, quando necessário, foram realizadas comparações entre pares seguindo os roteiros indicados pelo pacote Geomorph (Adams et al. 2020) para comparações entre pares se tratando das distâncias de Procrustes.

As Análises de Variáveis Canônicas (CVA) e Análise de Função Discriminante (DFA) foram conduzidas no software MorphoJ 1.07a. A significância estatística das diferenças entre pares nas formas médias foi analisada usando testes de permutação (10.000 rodadas de permutações) com distâncias de Mahalanobis e distâncias de Procrustes.



Margem posterior

CUAd

Figura 1. Desenho da asa de uma nova espécie de *Thraulodes*, manuscrito submetido recentemente na Zootaxa. 29 marcos anatômicos foram utilizados para a investigação das asas anteriores (a) e 15 marcos anatômicos para as asas posteriores (b) de Hagenulinae, adaptados à terminologia anatômica proposta por Kluge, 2004 para asas. Veja a tabela S3 para a descrição dos marcos

MP1.d

Evolução da forma da asa

Os marcos anatômicos obtidos para as asas (anteriores e posteriores) foram incluídos em uma matriz de caracteres contínuos e analisadas software TNT, versão 1.5 (Goloboff et al. 2008; Goloboff & Catalano, 2016) seguindo a estratégia de busca proposta para dados de marcos anatômicos. Este método realiza sobreposição e mapeamento de pontos de referência simultaneamente em um único procedimento e busca de configurações de pontos de referência ancestrais que minimizam o deslocamento de pontos de referência entre os nós ancestrais e descendentes ao longo dos ramos da árvore. Dessa forma, cada configuração é considerada um caráter e os marcos anatômicos de cada espécie como um estado de caráter (Catalano & Goloboff, 2012). As grades de deformação mostrando a deformação dos marcos anatômicos foram mapeadas na árvore filogenética proposta por Monjardim et al., 2019.

Resultados

Alometria das asas

A regressão da forma das asas anterior e posterior no tamanho do centróide foi responsável por 10,7% e 10,4 % da variação na forma, respectivamente. O teste de permutação mostrou que a alometria é significativa para as asas anterior e posterior (P = 0,0001). Um tamanho de asa anterior menor está associado a uma base de asa relativamente estreita, regiões média e cubital menores, além de uma asa mais longa e um ápice curvado em sentido superior, como observado em *Miroculis*. Por outro lado, um tamanho maior de asa anterior está associado a uma base de asa relativamente mais ampla, regiões média e cubital ampliadas e ápice reto, como em *Thraulodes*. As asas posteriores por sua vez, quando menores, como em *Hermanellopsis*, estão associadas a uma projeção costal maior, e a veia Sc terminando junto com a projeção costal, enquanto as asas posteriores maiores,

como em *Diamantina* estão associadas a uma projeção costal menor, arredondada e Sc terminando após a projeção costal (Figura 2).



Figura 2. Gráficos de regressão mostrando a alometria das asas anterior (a) e posterior (b). Um contorno deformado da asa anterior representa os extremos grandes e pequenos do tamanho da asa. A regressão revela que o tamanho foi responsável por 10,7% da variação da forma da asa anterior e 10,4 % para a posterior. As asas para a direção negativa do gráfico estão representadas à esquerda enquanto as positivas estão à direita.

Análises da forma das asas anteriores

A PCA para variação da forma da asa anterior entre os táxons mostrou que aproximadamente 64% da variação total pode ser explicada pelos dois primeiros componentes principais (PC1 = 50,64%, PC2= 13,80%). Não há uma separação clara entre as subtribos Hermanellina, Hagenulina, Ulmeritina e os gêneros *Hermanellopsis* e *Microphlebia* pertencentes à subtribo Miroculina no morfoespaço (Figura 3). O grupo externo apresentou uma variação da forma da asa anterior distinta da variação dos demais gêneros. A Análise de Variância (ANOVA) de Procrustes, entre todas as subtribos apresentaram valor p <0,05, com exceção de Hermanellina x Ulmeritina, que apresentou valor p = 0.056 (Tabela 1).

Os espécimes do gênero *Miroculis* tenderam aos valores positivos do PC1, caracterizado principalmente por uma variação na região média e cubital das asas anteriores, cujos marcos anatômicos dessas regiões (MA, IMA, IMP, MP2, Icu1 e Icu2) estão mais próximos da região proximal da asa, exibindo uma ampliação dessas áreas (média e cubital). Já os marcos anatômicos presentes na região apical (Sc.d, RA.d e RSa) estão mais próximos para a parte superior da asa, enquanto os da margem posterior (RSp, MA1, IMA.d, MA2, MP1, IMP1.d, MP2.d, CuA.d, Icu1.d, Icu2.d, CuP.d e A.d) estão próximos para a parte inferior da asa, exibindo assim uma asa com uma amplitude maior e de formato triangular (Figura 7).

Os integrantes das subtribos Hagenulina, Hermanellina, Ulmeritina e os gêneros *Microphlebia* e *Hermanellopsis*, pertencentes à subtribo Miroculina, tenderam ao PC1 negativo e ao PC2. Estes PC's por sua vez, contribuíram para a variação das regiões média e cubital de forma contrária, ou seja, os marcos anatômicos dessas regiões estão próximos à região distal da asa, com uma redução dessas áreas (média

e cubital). Os marcos anatômicos presentes nas regiões apical e margem posterior estão mais próximos das partes inferiores e superiores da asa, respectivamente, promovendo um estreitamento desta asa e com formato oval (Figura 7).

As duas primeiras variáveis canônicas (Figura 4) responderam juntas por cerca de 75% da variação total (CV1 = 44,95%, CV2 = 30,87%) e demonstraram uma segregação clara entre os integrantes das subtribos Hermanellina e Hagenulina, apresentando apenas uma sobreposição entre representantes de Miroculina e Ulmeritina. As distâncias de Mahalanobis obtidas por comparações de pares de todos as quatro subtribos revelaram diferenças significativas variando de 7,3318 entre Miroculina e Ulmeritina a 13,9786 entre Hermanellina e Hagenulina (Tabela 2).

Os maiores valores de CV1 indicaram que a subtribo Hermanellina se caracteriza por possuir asas mais estreitas e com as regiões média e cubital reduzidas. Já Hagenulina, está associada aos valores máximos de CV2, caracterizados por um estreitamento ainda maior das asas. Os menores valores de CV1 e CV2 foram associados às subtribos Miroculina e Ulmeritina, que por sua vez, possuem as asas mais amplas e com as regiões média e cubital amplas. Asas mais amplas, como em *Miroculis*, tem formato triangular, enquanto asas menos amplas são mais ovaladas, como em *Hagenulopsis* (Figura 7). A análise da função discriminante (DFA) foi capaz de classificar corretamente 100% dos indivíduos (Tabela 3).



Figura 3. Diferenças na forma das asas anteriores de Hagenulinae e grupo externo (*Massartella**), com base na Análise de Componentes Principais em nível de gênero. As elipses representam as subtribos da subfamília. As grades de deformação ilustram as mudanças de forma da média geral ao longo dos eixos PC1 e PC2 em direções positivas.



Figura 4. Gráfico de dispersão mostrando a variação na forma das asas anteriores de Hagenulinae e grupo externo (*Massartella* *), ao longo dos dois primeiros eixos canônicos (CV1 e CV2) com elipses de confiança de 90%. As elipses representam as subtribos. Os desenhos de contorno das asas do eixo do CV1 indicam as formas para as direções positivas.

Tabela 1. Diferença par-a-par da Análise de Variância (ANOVA) de Procrustes entre as subtribos dasubfamília e grupo externo para as asas anteriores.

Grupos	d	UCL (95%)	Z	Pr > d
Grupo externo: Hagenulina	0.14617986	0.08891733	5.141073	0.001
Grupo externo: Hermanellina	0.12897678	0.08271386	4.921092	0.002
Grupo externo: Miroculina	0.13315676	0.08314665	5.177632	0.001
Grupo externo: Ulmeritina	0.12701797	0.09364947	3.615604	0.003
Hagenulina: Hermanellina	0.05980797	0.03810882	4.470668	0.004
Hagenulina: Miroculina	0.10339565	0.03959440	9.514024	0.001
Hagenulina: Ulmeritina	0.06689537	0.05727550	2.735459	0.017
Hermanellina: Miroculina	0.07537011	0.02396774	11.748843	0.001
Hermanellina: Ulmeritina	0.04678232	0.04711941	1.688456	0.056
Miroculina :Ulmeritina	0.09100624	0.04877908	5.966484	0.001

Tabela 2. Distâncias de Mahalanobis entre as subtribos para as asas anteriores. Os valores P obtidos a partir dos testes de permutações (10.000 rodadas de permutações) para as quatro subtribos foram significativos (P <0,0001). Em preto as distâncias de Mahalanobis e em vermelho as distâncias de Procrustes.

Grupos	Hagenulina	Hermanellina	Miroculina	Ulmeritina	Grupo externo
Hagenulina	-	0,0596	0,1029	0,0667	0,1452
Hermanellina	13,9786	-	0,0750	0,0466	0,1280
Miroculina	12,5941	8,1134	-	0,0906	0,1322
Ulmeritina	13,3801	10,2862	7,3318	-	0,1261
C	22.2602	22 2255	21 0022	24 1014	
Grupo externo	22,3683	22,3257	21,9032	24,1914	-

Tabela 3. Sumário estatístico dos indivíduos classificados conforme escores gerados pela análise de função discriminante entre os grupos estabelecidos a priori: Ulmeritina, Miroculina, Hermanellina, Hagenulina e *Massartella* (*grupo externo), para as asas anteriores.

Classificação dos escores gerados pela função discriminante					Total
Subtribos	Ulmeritina	Miroculina	Hermanellina	Hagenulina	
Ulmeritina	7	0	0	0	7
Miroculina	0	52	0	0	52
Hermanellina	0	0	57	0	57
Hagenulina	0	0	0	12	12

Análises da forma das asas posteriores

A PCA para variação da forma da asa posterior entre os táxons mostrou que aproximadamente 52% da variação total pode ser explicada pelos dois primeiros componentes principais (PC1 = 35,31%, PC2= 16,70%). Esses dois PC's separaram as subtribos no morfoespaço (Figura 5). O grupo externo apresentou uma variação da forma da asa posterior dentro da variação da subtribo Ulmeritina. A Análise de Variância (ANOVA) de Procrustes entre todas as subtribos apresentaram Valor p \leq 0,05, com exceção do Grupo externo x Ulmeritina, que apresentou um Valor p = 0,095 (Tabela 4).

As asas de Hermanellina e dos gêneros *Hermanellopsis* e *Microphlebia* tenderam aos valores positivos de PC1, caracterizadas por possuírem a região da base estreita com os marcos anatômicos dessa região (C, Sc, RA, MP1 e CuA) mais próximos um dos outros e a projeção costal projetada para a área apical da asa, o que promove a formação de uma inclinação maior entre as veias C e Sc, e apresentam uma projeção costal proeminente. Enquanto as asas de Ulmeritina, dos gêneros *Miroculis* e

Thraulodes, pertencentes a tribo Miroculina, tenderam aos menores valores de PC1, caracterizadas por uma asa de formato oval, região da base mais larga, com os marcos anatômicos dessa região mais distantes um dos outros e a projeção costal projetada para área basal da asa, o que acarreta em uma menor inclinação entre as veias C e Sc e, por sua vez, apresentam uma diminuição significativa da projeção costal.

As duas primeiras variáveis canônicas (Figura 6) responderam juntas por cerca de 93% da variação total (CV1 = 75,14%, CV2 = 18,29%) e demonstraram uma segregação clara das subtribos. As distâncias de Mahalanobis obtidas por comparações de pares de todos as quatro subtribos revelaram diferenças significativas (P ≤0,0001), variando de 5,3144 entreMiroculina e Hermanellina a 8,7492 entre Hermanellina e Ulmeritina (Tabela 5).

Miroculina (com exceção dos gêneros *Hermanellopsis* e *Microphlebia*) e Ulmeritina tenderam aos valores em direções positivas de CV1, caracterizados por asas ovais, com a região da base ampla e com uma deformação em direção proximal, e uma diminuição significativa da projeção costal. Os espécimes pertencentes a Hermanellina e aos gêneros *Hermanellopsis* e *Microphlebia* tenderam aos valores positivos de CV2, caracterizados por asas com a região da base estreita e uma grande projeção costal. A análise de função discriminante (DFA) foi capaz de classificar corretamente 98% dos indivíduos, segundo a análise dois espécimes de Miroculina foram classificados em Hermanellina (Tabela 6).



Figura 5. Diferenças na forma das asas posteriores de Hagenulinae e grupo externo (*Massartella* *), com base na Análise de Componentes Principais em nível de gênero. As elipses representam as subtribos da subfamília. As grades de deformação ilustram as mudanças de forma da média geral ao longo dos eixos PC1 e PC2 em direções positivas.



Figura 6. Gráfico de dispersão mostrando a variação na forma das asas posteriores de Hagenulinae e grupo externo (*Massartella* *), ao longo dos dois primeiros eixos canônicos (CV1 e CV2) com elipses de confiança de 90%. As elipses representam as subtribos. Os desenhos de contorno das asas em cada eixo do CV indicam as formas das asas para as pontuações positivas do respectivo CV.


Figura 7. Prancha com fotos das asas anteriores e posteriores dos imagos machos de representantes das quatro subtribos de Hagenulinae. Hagenulina: *Askola sp nov*: 1 - asa anterior. Ulmeritina: *Ulmeritoides angelus*: 2 - asa anterior; 3 - asa posterior. Miroculina: *Miroculis marauiae*: 4 - asa anterior; 5 - asa posterior; 5.1 - asa posterior aumentada. *Microphlebia pallida*: 6 - asa anterior; 7 - asa posterior; 7.1 - asa posterior aumentada. *Thraulodes luizgonzagai*: 8- asa anterior; 9 - asa posterior; 11.1 - asa posterior aumentada. *Hydrosmilodon gilliesae*: 12 - asa anterior; 13 - asa posterior; 13.1 - asa posterior aumentada.

Grupos	d	UCL (95%)	Z	Valor p
Grupo externo: Hermanellina	0.2741899	0.14714054	6.136549	0.001
Grupo externo: Miroculina	0.2375637	0.14691853	4.825363	0.002
Grupo externo: Ulmeritina	0.1687754	0.17925266	1.475457	0.095
Hermanellina: Miroculina	0.1260174	0.04482963	10.995222	0.001
Hermanellina: Ulmeritina	0.1873882	0.10856639	5.693540	0.001
Miroculina: Ulmeritina	0.1405852	0.10543931	3.527854	0.002

Tabela 4. Diferença par-a-par da Análise de Variância (ANOVA) de Procrustes entre as subtribos da subfamília e grupo externo para as asas posteriores. Valores p significantes destacados em vermelho.

Tabela 5. Distâncias de Mahalanobis entre as subtribos para as asas posteriores. Os valores P obtidos a partir dos testes de permutações (10.000 rodadas de permutações) para as quatro subtribos foram significativos (P <0,0001). Em preto as distâncias de Mahalanobis e em vermelho as distâncias de Procrustes.

Grupos	Grupo externo	Miroculina	Ulmeritina	Hermanellina
Grupo externo	-	0,2321	0,1660	0,2672
Miroculina	11,1185	-	0,1400	0,1296
Ulmeritina	9,2468	5,6649	-	0,1904
Hermanellina	13,8599	5,3144	8,7492	-

Tabela 6. Sumário estatístico dos indivíduos classificados conforme escores gerados pela análise de função discriminante entre os grupos estabelecidos a priori: Ulmeritina, Miroculina, Hermanellina e *Massartella* (*grupo externo), para as asas posteriores.

Classificação dos escores gerados pela função discriminante					Total
Subtribos	Ulmeritina	Miroculina	Hermanellina	Massartella*	
Ulmeritina	3	0	0	1	4
Miroculina	0	46	2	0	48
Hermanellina	0	0	40	0	40
Massartella*	0	0	0	2	2

Análises de tamanho - asa anterior e posterior

Os gráficos do tipo boxplot exibindo o comportamento do tamanho do centróide para as asas anteriores e posteriores apresentaram resultados semelhantes (Figura 7). Os valores de Tukey mostraram que apenas os tamanhos dos centroides da subtribo Ulmeritina foram significativamente diferentes das outras subtribos (Tabela 7, Tabela 8) e esta subtribo apresenta os maiores valores dos centroides, enquanto as demais não apresentam diferenças significativas entre elas. A regressão do tamanho do centróide da asa anterior para a asa posterior explica cerca de 30% da variação (Figura 9).



Figura 8. (a) Gráficos do tipo boxplot representando o comportamento do tamanho do centróide das asas anteriores das subtribos de Hagenulinae. (b) Gráficos do tipo boxplot representando o comportamento do tamanho do centróide das asas posteriores das subtribos de Hagenulinae.

Grupos	dif	min	máx	Valor p
Hermanellina: Hagenulina	-0.3810	-3.2567	2.4946	0.99609
Miroculina: Hagenulina	-1.7159	-4.6155	1.1837	0.47620
Ulmeritina: Hagenulina	4.5820	0.2758	8.8882	0.03095
Miroculina: Hermanellina	-1.3348	-3.0711	0.4014	0.21484
Ulmeritina: Hermanellina	4.9630	1.3368	8.5893	0.00215
Ulmeritina: Miroculina	6.2979	2.6526	9.9431	0.00004

Tabela 7. Comparações par-a-par do tamanho do centróide das asas anteriores das subtribos de Hagenulinae. Valores p significantes destacados em vermelho.

Tabela 8. Comparações par-a-par do tamanho do centróide das asas posteriores das subtribos de Hagenulina. Valores p significantes destacados em vermelho.

Grupos	dif	min	máx	Valor p
Miroculina-Hermanellina	0.22173	-0.07204	0.51552	0.20482
Ulmeritina-Hermanellina	1.23236	0.51274	1.95197	0.00012
Ulmeritina-Miroculina	1.01062	0.29648	1.72476	0.00203



Figura 9. Gráfico de regressão mostrando a relação entre o tamanho do centróide das asas anteriores e posteriores. Valor de R² = 0.308.

Reconstrução Ancestral das asas da subfamília

Asas anteriores

O ancestral comum mais recente de Hagenulinae, quando comparado com o grupo externo, apresentou uma clara diminuição do tamanho das asas anteriores, com uma diminuição considerável das regiões da base da asa, apical e margem posterior da asa.

A forma plesiomófica entre Ulmeritina e Hagenulina se mostrou conservada quando comparada ao ancestral comum de todos os Hagenulinae, e se manteve também no gênero *Hagenulopsis*. Já a forma ancestral entre Miroculina e Hermanellina exibiu uma diminuição das regiões apical e cubital.



Figura 10. Reconstrução das formas plesiomóficas das asas anteriores em Hagenulinae e o grupo externo. Em cada nó é possível observar a sobreposição da forma plesiomórfica (linha cinza pontilhada) com a forma inferida para o nó (linhas e pontos vermelhos). O deslocamento do ponto de referência inferido entre o par plesiomórfico e o derivado é mostrado em azul. A árvore filogenética foi resumida e reconstruída a partir de resultados moleculares anteriores (Monjardim et al. 2019).

Asas posteriores

O ancestral comum mais recente de Hagenulinae, quando comparado com o grupo externo, apresentou uma diminuição considerável do tamanho das asas posteriores, exibindo em uma diminuição das regiões da base da asa, margem anterior e margem posterior da asa. Entretanto, conforme a base diminui há um aumento da projeção costal.

A forma plesiomórfica entre Ulmeritina e Hagenulina se mostrou conservada quando comparada ao ancestral comum de todos os Hagenulina. Já a forma ancestral entre Miroculina e Hermanellina exibiu uma diminuição das regiões da base e margem posterior da asa. A ausência da asa posterior está presente tanto em Hagenulina nos gêneros *Askola e Hagenulopsis* e em Hermanellina, nos gêneros *Perissophlebiodes* e *Bessierus*, entretanto a forma plesiomórfica de ambos os grupos é recuperada com presença das asas posteriores.



Figura 11. Reconstrução das formas plesiomóficas das asas posteriores em Hagenulinae e o grupo externo (*Massartela*). Em cada nó é possível observar a sobreposição da forma plesiomórfica (linha cinza pontilhada) com a forma inferida para o nó (linhas e pontos vermelhos). O deslocamento do ponto de referência inferido entre o par plesiomórfico e o derivado é mostrado em azul. A árvore filogenética foi resumida e reconstruída a partir de resultados moleculares anteriores (Monjardim et al. 2019).

Discussão

As análises de alometria mostraram que o tamanho desempenha um papel significativo na forma das asas anteriores e posteriores de Hagenulinae. Um tamanho maior para a asa anterior está associado a uma base de asa mais ampla, regiões média e cubital ampliadas e ápice reto, em comparação com as espécies de asas menores. Estas, por sua vez, são caracterizadas por possuir uma base de asa relativamente menor, regiões média e cubital menores, além de uma asa mais longa e um ápice curvado em sentido superior. O aumento da concentração da área da asa em direção à base da asa em asas maiores não só promove um voo menos exigente energeticamente (Ellington, 1984; Weis-Fogh, 1973), mas também resulta em um maior alcance de velocidades (Wootton, 1992), como foi mostrado para Odonata (Outomuro et al. 2013). O aumento da área das asas em direção à base também é importante para que os indivíduos maiores suportem o seu próprio peso durante o voo (Edmunds, 1972; Edmunds & Traver, 1954; Norberg, 2002; Wootton & Kukalová-Peck, 2000). Este padrão foi encontrado em espécies maiores como por exemplo para *Thraulodes*, Ulmeritoides. Espera-se que a forma de asa associada ao seu menor tamanho, como observado para o gênero Miroculis, em que a área da asa é aumentada em direção ao ápice, seja relativamente mais cara energeticamente (Outomuro et al. 2013), sugerindo um voo curto, porém mais ágil neste grupo. Como os efemerópteros apresentam um período de vida curto quando adultos, a maioria das estruturas são adaptadas para a reprodução (Edmunds & Traver, 1954), e o comportamento de acasalamento e a postura de ovos dependem do voo. Desta forma, o voo nupcial pode estar muito atrelado a essa mudança de forma do que em outros insetos por exemplo, que o forrageamento ou fugir dos predadores são

importantes também na mudança de forma das asas. Benítez et al. (2011) explicaram que essa mudança morfológica nas veias em Lepidópteros pode ser devido à dispersão, migração e seleção sexual. Em diversos grupos de insetos, essas mudanças nos machos podem ser resultado do voo nupcial, territorialidade e seleção sexual, e nas fêmeas, devido ao seu comportamento de voo em busca de locais ideais para ovipositar (Dockx, 2007; Johansson et al., 2009).

Em Hagenulinae o padrão da base da asa quando observamos a forma de maneira isolada do tamanho, permanece a mesma, com pouquíssimas mudanças. Como as asas não contêm músculos, toda a geração de força ativa e controle estão localizados no tórax ou nos escleritos articulares, localizados na base extrema da asa (Wootton & Kukalová-Peck, 2000). Zhou (2007) postulou que a presença do braço costal (uma veia curta que vai da base da asa entre C e Sc, terminando em RA) resulta em um movimento comum das veias C, Sc e R. Portanto, o tamanho do braço costal parece estar relacionado ao tamanho da base da asa e ao arranjo dessas veias. Este pode ser um dos motivos que explica o fato dessas três veias presentes na base se apresentarem sempre da mesma forma em Hagenulinae.

Ao desassociar o formato do tamanho podemos ter uma visão de onde vem essa variação, e assim como relatado por Savage (1983), identificamos que para Hagenulinae as relações entre largura e comprimento das asas anteriores e posteriores parecem estar fortemente correlacionadas com o tamanho dos espécimes e os princípios aerodinâmicos. Desta forma, asas maiores possuem bases maiores, enquanto asas menores apresentam bases menores. Pode-se observar também que as características relacionadas a largura e comprimento apresentaram variações ao longo da filogenia do grupo, onde grupos filogeneticamente distantes

compartilham padrões semelhantes relacionados a essas características, ou seja, a filogenia não é responsável por este padrão. As relações observadas entre a base e o formato do ápice da asa têm sido consideradas fortemente ligadas ao estilo de voo e desempenho aerodinâmico (Betts & Wootton, 1988; Wootton & Newman, 2008).

O arranjo das veias, por sua vez, parece estar relacionado com a história filogenética das espécies, pois encontramos padrões bem definidos em grupos intimamente relacionados, como propôs Savage (1983). Para Hagenulinae os padrões de separação mais evidentes para o grupo estão a nível genérico. Quando observamos os resultados obtidos na PCA, podemos observar um padrão de agrupamento entre gêneros e isto pode estar relacionado ao mesmo arranjo da venação compartilhado entre espécimes do mesmo gênero, o que pode indicar a presença de autapormorfias. Por exemplo, na subfamília Hagenulina, no gênero Hagenulopsis, a veia ICu1 das asas anteriores estão fixadas na base da veia CuP, enquanto em Askola ICu1 está fixada na base de CuA. Apesar de próximos no morfoespaço, existe um padrão de agrupamento entre os indivíduos pertencentes ao mesmo gênero. Em Ulmeritina, o gênero Ulmeritoides possui a veia Rs das asas anteriores formando dois triângulos, projeção costal das asas posteriores arredondadas, veia Sc das asas posteriores terminando próximo ao ápice da asa. O gênero Thraulodes (tribo Miroculina) apresentou um padrão característico de agrupamento no morfoespaço Estes, possuem Rs das asas anteriores sem formar dois triângulos, asas posteriores com projeções costais proeminentes e mais arredondadas (raramente agudas) e Sc terminando após a projeção costal. *Miroculis,* também apresentou um padrão claro de agrupamento. Este gênero possui veia MP2 das asas anteriores unidas na base a MP1 e CuA por veias transversais ou veia MP2 reduzida e unida a IMP por uma veia

transversal, projeção costal das asas posteriores bem desenvolvidas, agudas, ápice em forma de tenda. Microphlebia possui veia MP das asas posteriores não bifurcada, projeção costal das asas posteriores bem desenvolvidas, agudas arredondadas e veia Sc das asas posteriores terminando na base da projeção costal. Enquanto Hermanellopsis, possui asa posterior com projeção costal bem desenvolvida e bastante aguda. Já os gêneros pertencentes a Hermanellina apresentam sobreposições entre vários deles, e não é possível ver um padrão claro de separação entre seus gêneros, pois compartilham, em sua grande parte, um arranjo de venações em comum, MA assimétrica, projeções costais sempre agudas e proeminentes para as asas posteriores, Sc das asas posteriores terminando na base da projeção costal. Kluge (1994, 2008), ao propor a tribo Hagenulini (agora elevada a subfamília Hagenulinae), a distingue dos demais Atalophlebiinae pela perda da sutura patelotibial em todas as pernas de larvas e adultos e os caracteres das asas são enquadrados por ele em um status filogenético obscuros. A forquilha de MA assimétrica compartilhada entre os Hermanellina, por exemplo, é considerada por Kluge (2008) uma plesiomorfia para Leptophlebiidae, e por este motivo, precisamos ter um cuidado redobrado ao analisar caracteres presentes nas venações das asas para estes gêneros. Kluge (2008) inclusive propõe que os gêneros Traverella, Hylister, Hermanella, Needhamella, Hydrosmilodon, Paramaka e Leentvaaria como um único gênero Hermanella s.1. e dividi-lo em cinco subgêneros: Hermanella, Needhamella, Leentvaaria, Traverella e Hylister.

Nossos resultados para as variáveis canônicas apontaram diferenças consideráveis na forma das asas de Hagenulinae, principalmente relacionadas às asas posteriores. A análise de componentes principais, que geralmente identifica apenas padrões de

variação muito evidentes, também detectou uma segregação mais evidente das subtribos para as asas posteriores. Esses resultados podem indicar que a forma da asa posterior seja mais conservada dentro de cada grupo, ou seja, os mesmos caracteres são mantidos dentro das subtribos, e, por este motivo, se separam melhor no morfoespaço, em comparação ao comportamento da forma para as asas anteriores, que se revelou mais plástica e menos conservada dentro das subtribos. Desta forma, os caracteres ligados às projeções costais das asas posteriores parecem ser mais seguros para definir melhor os grupos de Hagenulinae. Enquanto caracteres das asas anteriores parecem ser compartilhados entre diversos grupos, como a veia MA assimétrica, e são caracteres ruins para distingui-los.

É importante salientar que tanto as análises canônicas para as asas anteriores e posteriores, quanto às análises de componentes principais para as asas posteriores mostraram uma sobreposição no morfoespaço entre Miroculina e Ulmeritina. Na PCA é possível observar que essa sobreposição se dá entre os gêneros *Thraulodes* e *Ulmeritoides*. Relatamos anteriormente que o tamanho tem um efeito significativo na forma das asas anteriores e posteriores para Hagenulinae e esta observação parece estar relacionada ao maior tamanho das asas de *Ulmeritoides* e *Thraulodes*, que possuem influência alométrica. Esses dois gêneros possuem uma área de asa aumentada em direção à base, tanto para as asas anteriores, quanto para as posteriores. Esse aumento em direção à base é importante para que as asas suportem o peso de espécies maiores (Wootton & Kukalová-Peck, 2000).

No entanto, a alometria não explica toda a variação na forma, isto pode sugerir que outros processos relacionados aos fatores ambientais, funcionais do voo, desenvolvimento ou comportamentais também devem contribuir para as mesmas características da variação da forma das asas neste grupo. O tamanho limitado da

amostra para as subtribos Ulmeritina e Hagenulina tornou difícil ver os padrões de agrupamento nos PCA's, e essas subtribos ficaram sobrepostas com Hermanellina no morfoespaço para as asas anteriores. Adicionar mais espécimes para os grupos será importante para avaliar o seu comportamento, e os escores obtidos a partir das análises de funções discriminantes indicam que a classificação de um novo indivíduo em um dos grupos se fará com uma probabilidade de acerto muito grande, ou seja, ao se analisar uma asa de qualquer subtribo, apenas utilizando os dados morfométricos propostos neste estudo, será possível classificá-los corretamente. Em todos os PCA's, tanto para a asa anterior quanto posterior, a maior quantidade da variação pode ser explicada pelo PC1. Isto pode indicar que a variação da forma no conjunto de dados está concentrada em uma única direção, sugerindo que a seleção pode ter sido o processo evolutivo a contribuir para a variação fenotípica do grupo (Pereira-da-Conceicoa et al. 2018; Arthur, 2001; Hunt, 2007; Klingenberg, 2010; Schluter, 1996). Porém, essas mudanças também podem surgir de processos evolutivos aleatórios, como deriva genética, efeito fundador ou gargalos populacionais (Brown & Lomolino, 1998; Heads, 2005; 358 Legendre & Makarenkov, 2002; Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). Portanto, mais investigações são necessárias sobre a aerodinâmica de voo de vários grupos da ordem, principalmente relacionados aos hábitos dos imagos (reconhecimento de parceiros, voo nupcial, oviposição, requisitos de habitat, prevenção de predadores) para elucidar os processos evolutivos que contribuíram para as configurações morfológicas atuais. Além disso, um banco de dados com as asas da ordem seria extremamente útil para análises futuras, como por exemplo que incluíssem questões de modularidade e testes de seleção e deriva, para responder mais lacunas sobre a evolução das asas de Ephemeroptera.

Agradecimentos

Agradecemos a Mateus C. Loss, Caroline Raidan e Jhon M. Lopez pela ajuda com as análises, e ao Dr. Paulo Vilela Cruz pelas fotos dos espécimes de *Bessierus*. Agradecemos ao IEMA (Instituto Estadual do Meio Ambiente, Estado do Espírito Santo), ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis) pela autorização de recolha (processos n.º 11239-1, 16719-1 e 12777-1). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para TBA (processo 88882.385175 / 2019-01) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para FFS (processo 305847/2015/5 e 309666 / 2019-8).

Referências

- Almudi, I., Vizueta, J., Wyatt, C. D. R., de Mendoza, A., Marlétaz, F., Firbas, P. N., ... Casares, F. (2020). Genomic adaptations to aquatic and aerial life in mayflies and the origin of insect wings. *Nature Communications*, *11*(1), 2631.
- Arthur, W. (2001). Developmental drive: an important determinant of the direction of phenotypic evolution. *Evolution & Development*, *3*(4), 271–278.
- Benítez, H. A., Sanzana, M.-J., Jerez, V., Parra, L. E., Hernández, C. E., & Canales-Aguirre, C. B. (2013). Sexual Shape and Size Dimorphism in Carabid Beetles of the GenusCeroglossus: is Geometric Body Size Similar Between Sexes Due to Sex Ratio? *Zoological Science*, Vol. 30, pp. 289–295. https://doi.org/10.2108/zsj.30.289

- Betts, C. R., & Wootton, R. J. (1988). Wing Shape and Flight Behaviour in Butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea): A Preliminary Analysis. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 138, pp. 271–288. https://doi.org/10.1242/jeb.138.1.271
- Breuker, C. J., Gibbs, M., Van Dyck, H., Brakefield, P. M., Klingenberg, C. P., & Van Dongen, S. (2007). Integration of wings and their eyespots in the speckled wood butterfly Pararge aegeria. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 308(4), 454–463.
- Clark-Hachtel, C. M., & Tomoyasu, Y. (2020). Two sets of candidate crustacean wing homologues and their implication for the origin of insect wings. *Nature Ecology* & Evolution, 4(12), 1694–1702.
- Devries, P. J., Penz, C. M., & Hill, R. I. (2010). Vertical distribution, flight behaviour and evolution of wing morphology in Morpho butterflies. *The Journal of Animal Ecology*, *79*(5), 1077–1085.

Domínguez, E. (2006). Ephemeroptera de América Del Sur. Pensoft Publishers.

- Domínguez, E. (2009). Overview and phylogenetic relationships of the two-winged genera of South American Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Aquatic Insects*, Vol. 31, pp. 63–71. https://doi.org/10.1080/01650420802518077
- Dominguez, E., & Abdala, V. (2019). Morphology and evolution of the wing bullae in
 South American Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *Journal of Morphology*, Vol.
 280, pp. 95–102. https://doi.org/10.1002/jmor.20920

- Domínguez, E., Cuezzo, M. G., & Clavier, S. (2019). The phylogenetic relationships of the two-winged South American Leptophlebiidae genera revisited with first description of the male imago of Bessierus Thomas & Orth (Insecta: Ephemeroptera). *Zootaxa*, Vol. 4674, pp. 375–385. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4674.3.6
- Drake, A. G., & Klingenberg, C. P. (2008). The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 275(1630), 71–76.
- Dudley, R., & Pass, G. (2018). Wings and powered flight: Core novelties in insect evolution. Arthropod Structure & Development, Vol. 47, pp. 319–321. https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.06.006
- Dudley, R., & Srygley, R. (1994). FLIGHT PHYSIOLOGY OF NEOTROPICAL BUTTERFLIES: ALLOMETRY OF AIRSPEEDS DURING NATURAL FREE FLIGHT. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 191, pp. 125–139. https://doi.org/10.1242/jeb.191.1.125
- Edmunds, G. F. (1972). Biogeography and Evolution of Ephemeroptera. *Annual Review of Entomology*, Vol. 17, pp. 21–42. https://doi.org/10.1146/annurev.en.17.010172.000321
- Ellington, C. P. (1984). The Aerodynamics of Flapping Animal Flight. *American Zoologist*, Vol. 24, pp. 95–105. https://doi.org/10.1093/icb/24.1.95
- Goloboff, P. A., & Catalano, S. A. (2011). Phylogenetic morphometrics (II): algorithms for landmark optimization. *Cladistics*, Vol. 27, pp. 42–51. https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00318.x

- Goloboff, P. A., & Catalano, S. A. (2016). TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics*, Vol. 32, pp. 221– 238. https://doi.org/10.1111/cla.12160
- Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, Vol. 24, pp. 774–786. https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x
- Grimaldi, D., Engel, M. S., Engel, M. S., & Senior Curator and Professor Michael S Engel. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Heads, M. (2005). Dating nodes on molecular phylogenies: a critique of molecular biogeography. *Cladistics*, Vol. 21, pp. 62–78. https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2005.00052.x
- Johansson, F., Söderquist, M., & Bokma, F. (2009). Insect wing shape evolution: independent effects of migratory and mate guarding flight on dragonfly wings. *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 97, pp. 362–372. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01211.x
- Klingenberg, C. P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(9), 623–635.
- Kluge, N. (1994). A revision of Leptophlebiidae of Cuba (Ephemeroptera). *Zoosystematica Rossica.* 2(2) 1993: 247–285
- Kluge, N. (2004). The Phylogenetic System of Ephemeroptera. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0872-3
- Kluge, N. (2008). A new taxon Hermanellonota, or subtribe Hermanellini subtr.n. (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Hagenulini), with description of three new species from Peruvian Amazonia. *Russian Entomol. J.* 16(4): 385-400

- Kukalová-Peck, J. (1985). Ephemeroid wing venation based upon new gigantic Carboniferous mayflies and basic morphology, phylogeny, and metamorphosis of pterygote insects (Insecta, Ephemerida). *Canadian Journal of Zoology*, Vol. 63, pp. 933–955. https://doi.org/10.1139/z85-139
- Kukalová-Peck, J. (2008). Phylogeny of Higher Taxa in Insecta: Finding Synapomorphies in the Extant Fauna and Separating Them from Homoplasies. *Evolutionary Biology*, Vol. 35, pp. 4–51. https://doi.org/10.1007/s11692-007-9013-4
- Marcus, L. F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P., & Slice, D. E. (2013). *Advances in Morphometrics*. Springer Science & Business Media.
- Monjardim, M., Paresque, R., & Salles, F. F. (2020). Phylogeny and classification of Leptophlebiidae (Ephemeroptera) with an emphasis on Neotropical fauna. *Systematic Entomology*, Vol. 45, pp. 415–429. https://doi.org/10.1111/syen.12402
- Norberg, U. M. L., & Lindhe Norberg, U. M. (2002). Structure, form, and function of flight in engineering and the living world. *Journal of Morphology*, Vol. 252, pp. 52–81. https://doi.org/10.1002/jmor.10013
- Olsen, A. M., & Westneat, M. W. (2015). StereoMorph: an R package for the collection of 3D landmarks and curves using a stereo camera set-up. *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 6, pp. 351–356. https://doi.org/10.1111/2041-210x.12326
- Outomuro, D., Adams, D. C., & Johansson, F. (2013). Wing shape allometry and aerodynamics in calopterygid damselflies: a comparative approach. *BMC Evolutionary Biology*, *13*, 118.

- Outomuro, D., Dijkstra, K.-D. B., & Johansson, F. (2013). Habitat variation and wing coloration affect wing shape evolution in dragonflies. *Journal of Evolutionary Biology*, *26*(9), 1866–1874.
- Pereira-da-Conceicoa, L. L., Benítez, H. A., & Barber-James, H. M. (2019).
 Disentangling wing shape evolution in the African mayfly, Teloganodidae (Ephemeroptera). *Zoologischer Anzeiger*, Vol. 280, pp. 30–41. https://doi.org/10.1016/j.jcz.2019.02.005
- Prokop, J., Pecharová, M., Nel, A., Hörnschemeyer, T., Krzemińska, E., Krzemiński, W.,
 & Engel, M. S. (2017). Paleozoic Nymphal Wing Pads Support Dual Model of Insect Wing Origins. *Current Biology: CB*, 27(2), 263–269.

R: A Language and Environment for Statistical Computing: Reference Index. (2010).

- Ross, A. (2017). Insect Evolution: The Origin of Wings. *Current Biology: CB*, *27*(3), R113–R115.
- Ruffieux, L., Elouard, J., & Sartori, M. (1998). Flightlessness in mayflies and its relevance to hypotheses on the origin of insect flight. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, Vol. 265, pp. 2135–2140. https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0550
- Sartori, M. (2005). A new species of the genus Paramaka Savage & Dominguez, 1992
 with some comments on related genera (Ephemeroptera, Leptophlebiidae, Atalophlebiinae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, Vol. 40, pp. 237–245. https://doi.org/10.1080/01650520500208481
- Savage, H. M. (2009). Wing evolution within Miroculis and related genera (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from northern South America. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, Vol. 21, pp. 124–141. https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1983.tb00281.x

- Schluter, D. (1996). ADAPTIVE RADIATION ALONG GENETIC LINES OF LEAST RESISTANCE. *Evolution*, Vol. 50, pp. 1766–1774. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646. 1996.tb03563.x
- Smith, E., & Hendricks, R. (2017). Geometric morphometrics on shells (project). *MorphoBank Datasets*. https://doi.org/10.7934/p2642
- Snodgrass, R. E., & Eickwort, G. C. (1994). *Principles of Insect Morphology*. https://doi.org/10.7591/9781501717918
- Sroka, P., Godunko, R. J., Sinitshenkova, N. D., & Prokop, J. (2021). Life history, systematics and flight ability of the Early Permian stem-mayflies in the genus Misthodotes Sellards, 1909 (Insecta, Ephemerida, Permoplectoptera). *BMC Ecology and Evolution*, *21*(1), 97.
- Van Valkenburgh, B. (1999). MAJOR PATTERNS IN THE HISTORY OF CARNIVOROUS MAMMALS. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, Vol. 27, pp. 463–493. https://doi.org/10.1146/annurev.earth.27.1.463
- Weis-Fogh, T. (1973). Quick Estimates of Flight Fitness in Hovering Animals, Including Novel Mechanisms for Lift Production. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 59, pp. 169–230. https://doi.org/10.1242/jeb.59.1.169
- Wickham, H. (2016). Programming with ggplot2. Use R!, pp. 241–253. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_12
- Wootton, R. J. (1992). Functional Morphology of Insect Wings. *Annual Review of Entomology*, Vol. 37, pp. 113–140.
 https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.000553
- Wootton, R. J. (2009). Support and deformability in insect wings. *Journal of Zoology*, Vol. 193, pp. 447–468. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998. 1981.tb01497.x

- Wootton, R. J., & Kukalová-Peck, J. (2000). Flight adaptations in Palaeozoic Palaeoptera (Insecta). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *75*(1), 129–167.
- Wootton, R. J., & Newman, D. J. S. (2008). Evolution, diversification, and mechanics of dragonfly wings. *Dragonflies and Damselflies*, pp. 261–274. https://doi.org/10.1093/acprof: oso/9780199230693.003.0020

Material Suplementar

Subtribo	Gêneros	Analisados neste estudo
	Askola Peters	Х
	Borinquena Traver	-
	Careospina Peters	-
	<i>Ecuaphlebia</i> Dominguez	-
Hagenulina	Hagenulopsis, Ulmer	Х
	Hagenulus Eaton	-
	Neohagenulus Traver	-
	Traverina Peters	-
	Atopophlebia Flowers	-
Ulmeritina	Ulmeritoides Traver	Х
	Ulmeritus Traver	-
	Hermanellopsis, Demoulin	Х
NC: 1:	Microphlebia, Savage&Peters	Х
Miroculina	Miroculis Edmunds	Х
	Miroculitus Savage & Peters	-
	Bessierus Thomas & Orth	Х
	Farrodes Peters	Х
	Hermanella Needham & Murphy	Х
	Homothraulus Demoulin	-
II II.	Hydromastodon Savage & Peters	Х
Hermanellina	Hydrosmilodon Flowers & Dominguez	Х
	Hylister Dominguez & Flowers	Х
	Leentvaaria Demoulin	Х
	Needhamella Dominguez & Flowers	Х
	Paramaka Savage & Dominguez	Х

Tabela S1. Composição genérica das subtribos: Hagenulina, Ulmeritins, Miroculina e Hermanellina

Tabela S1. (Continuação)

Subtribo	Gêneros	Analisados neste estudo
	Perissophlebiodes Savage	X
Hermanellina	Rondophlebia Salles & Boldrini	Х
	Simothraulopsis Demoulin	Х
	Traverella Edmunds	Х

Tombo	Espécie	Sexo	Localidade
UFVB.EP-033	Askola froehlichi	Imago macho	Brasil, ES, Santa Teresa – Rebio Augusto Ruschi Córrego d'água
UFVB.EP-034	Askola michelin	Imago macho	Brasil, ES, Santa Teresa – Rebio Augusto Ruschi Córrego da estrada
UFVB.EP-038	<i>Askola</i> sp n	Imago macho	Brasil, ES, Santa Teresa – Rebio Augusto Ruschi Córrego d'água
UFVB.EP-039	Bessierus dolores	Imago macho	Roraima, Mucujaí
UFVB.EP-042	Bessierus riobranco	Imago macho	Amapá, Oiapoque
UFVB.EP-045	Diamantina ulmeri	Imago macho	Bahia, Lençóis – Chapada Diamantina
UFVB.EP-019	Farrodes caribbianus	Imago macho	Colômbia, Villa de los Cabaleros, Trampa luz
UFVB.EP-018a, b	Farrodes savagei	Imago macho	Colômbia, Mariquita, Granja
UFVB.EP-017a, b, c	Farrodes tepui	Imago macho	Colômbia, San Martin, Caño Camoa
UFVB.EP015a, b, c	Farrodes xingu	Imago macho	Colômbia, Amazônia, Letícia, F. AEAPE, Q. Arenosa
UFVB.EP-020a, b	Hagenulopsis minuta	Imago macho	Putumayo, Puerto Asis, Trampa Luz
UFVB.EP-046	Hagenulopsis diptera	Imago macho	PARNA Caparaó – Cachoeira da farofa
Ep-1675	Hermanella amere	Imago macho	Alegre, Espírito Santo
UFVB.EP-0207	Hermanella maculipenis	Imago macho	Pernambuco, São Benedito do Sul
EAR0094	Hermanellopsis incertans	Imago macho	
UFVB.EP-047	Hermanellopsis arsia	Imago macho	
Ep-4492a	Hermanella mazama	Imago macho	Boa Esperança, Espírito Santo
UFVB.EP-009a, b, c	Hydrosmilodon giliesae	Imago macho	Brasil, MS, Campo Grande, Fazenda duplo L, Cachoeira Engano
UFVB.EP-004a; 005a	Hydrosmilodon plagatus	Imago macho/fêmea	Brasil, ES, Sooretama – Rio São José
UFVB.EP-016a, b	Hydrosmastodon sallesi	Imago macho	Brasil, RO, Nova Londrina, Rio Urupá
UFVB.EP-032	Hylister obliquus	Imago macho	Brasil, MG, Ipaba
UFVB.EP-013	Hylister plaumanni	Imago macho	Brasil, ES, Alfredo Chaves, Matilde
UFVB.EP-011a, b, c	Leentvaria palpalis	Imago macho	Brasil, RR, Caracaraí, Rio Branco, Cachoeira bem querer
UFVB.EP-048	Massartela brieni	Imago macho	Santa Teresa – Espírito Santo
UFVB.EP-049	Microphlebia pallida	Imago macho	
UFVB.EP-001a, b, c	Miroculis chiribiquete	Imago macho	Colômbia, Quebra de la piscina, Estacion Puento Abeja
UFVB.EP-021 / UFVB.EP-022A	Miroculis cryptophallus	Imago macho/ fêmea	Brasil, AM, Manaus - Reserva A. Dueke, Igarapé Bolívia
UFVB.EP-050 a. b	Miroculis exilibranchia	Imago macho/fêmea	Brasil, ES, Pedro Canário, Rio Itaúnas
UFVB.EP-003a	Miroculis fittikaui	Imago macho	Brasil, AM, Barcelos - Serra do Aracá, Atributo do Igarapé do Cobra
UFVB.EP-023A / UFVB.EP-024	Miroculis froehlichi	Imago macho	Brasil, ES, Santa Teresa, Pinguela
UFVB.EP-035	Miroculis marauiae	Imago macho	Brasil, AM, Barcelos - Serra do Aracá, Igarapé do Cobra
UFVB.EP-036A	Miroculis marauiae	Imago macho	Brasil, AM, Barcelos - Serra do Aracá, Igarapé Anta
UFVB.EP-036B	Miroculis marauiae	Imago macho	Brasil, AM, Barcelos, Acamp. Base, Igarapé Anta, B03

Tabela S2. Lista das espécies utilizadas e seus respectivos números tombos e localidades.

Tabela S2. (Continuação)

Tombo	Espécie	Sexo	Localidade
UFVB.EP-002A, B, C	Miroculis mourei	Imago macho	#16
UFVB.EP-051	Miroculos cryptophallus	Imago macho	AM, Manaus - Reserva A. Dueke, Igarapé Bolívia
UFVB.EP-052	Miroculis sp aff caparaoensis	Imago macho	Minas Gerais, Espera Feliz, PARNA Caparaó, Pedra Menina
UFVB.EP-053	Miroculis warbeast	Imago macho	
UFVB.EP-054	Miroculis yuliae	Imago macho	Nova Xavantina, Mato Grosso
UFVB.EP-0407	Hermanella angeli	Imago macho	
Ep-1676c	Needhamella ehrhardti	Imago macho	Brasil, PE - Rio Pirangi, Jaqueira
UFVB.EP-055	Miroculis pronexion	Imago macho	Reserva f ducke - Manaus
UFVB.EP-056	Miroculis samba	Imago macho	Santa Teresa
UFVB.EP-007	Paramaka convexa	Imago macho	Brasil, RR, #4
UFVB.EP-008	Paramaka convexa	Imago macho	Brasil, RR, #8
UFVB.EP-037	Paramaka incognita	Imago macho	Brasil, RR, Paracaima - Igarapé Miangue (Dona Maria)
UFVB.EP-006D	Paramaka sp. nov	Imago macho	Colômbia, Meta, San Martin, Caño Camoa
UFVB.EP-057	Perissophlebiodes flinti	Imago fêmea	Santa Teresa
UFVB_EP_0399	Poranga sp	Imago fêmea	Brasil, ES, Santa Teresa, Rebio Augusto Ruschi, córrego bragacho
UFVB.EP-058	Rondophlebia rubra	Imago macho	Roraima
UFVB.EP-059	Simothraulopsis gracilianus	Imago macho	Alagoas, Bica da Juliana
UFVB.EP-060	Simothraulopsis demerara	Imago macho	Pernambuco, Rio Amaraji
UFVB.EP-061	Simothraulopsis caliginosus	Imago macho	Brasil, MG - Pedra Corrida
UFVB.EP-062	Simothraulopsis sinuosus	Imago macho	Brasil, PI, Batalha, Cachoeira do Urubu
UFVB.EP-063	Thraulodes bonito	Imago macho	Rio de Janeiro – Rio bonito de Lumiar
UFVB.EP-028a	Thraulodes luisae_	Imago macho	ES – PARNA Caparaó
UFVB.EP-025 / UFVB.EP-026	Thraulodes borun	Imago macho	Brasil, MG - Parque Estadual do Rio Doce, Rio Turvo
UFVB.EP-014A	Thraulodes luizgonzagai	Imago macho	Brasil, PE, Petrolina - Base Fluvial Ilha do Fogo, Rio São Francisco
UFVB.EP-064	Thraulodes itatiajanus	Imago fêmea	Brasil, ES, Pedra Menina, PARNA Caparaó
ufvbep028a	Thraulodes luisae	Imago macho	Brasil, MG, Araponga, Serra do Brigadeiro, Vale das Luas
ufvbep010a, B	Traverella maranhensis	Imago macho	Brasil, MA, Caxias, Pé da Serra
ufvbep029a	Ulmeritoides angelus	Imago macho	Brasil, MG, Jaboticatubas, Parque Nacional da Serra do Cipó, Córrego Bocaina
ufvbep030a, b	Ulmeritoides nigribulae	Imago macho	Brasil, MG, Parque Estadual do Rio Doce, Lagoa Carioca
UFVB.EP-065	Ulmeritoides araponga	Imago macho	Brasil, MG, Parque Estadual do Rio Doce, Lagoa Carioca

Marcos Anatômicos - Asa anterior	Veias	Marcos Anatômicos- Asa posterior	Veias
C	Costal	С	Costal
Sc	Subcostal – Proximal	PC	Projeção Costal
Sc.d	Subcostal – Distal	Sc	Subcostal – Proximal
RA.	Radial – Proximal	Sc.d	Subcostal – Distal
RA.d	Radial – Distal	RA	Radial – Proximal
RS	Setor Radial – Bifurcação de RS	RA.m	Radial – Bifurcação RA com MA
RSa	Setor Radial – Distal anterior	RA.d	Radial – Distal
RSp	Setor Radial – Distal posterior	RS	Setor Radial – Bifurcação de RS
МА	Medial anterior - Bifurcação MA	RSa	Setor Radial – Distal anterior
MA1	Medial anterior – Distal anterior	RSp	Setor Radial – Distal posterior
MA2	Medial anterior – Distal posterior	МА	Medial anterior – Proximal
ΙΜΑ	Intercalar medial – Anterior proximal	MP1	Medial posterior – Proximal
IMA1	Intercalar medial – Anterior distal	MP1.d	Medial posterior –Distal
МР	Medial posterior –Proximal	CUA	Cubital anterior – Proximal

Tabela S3. Terminologia das veias da asa anterior e posterior e dos marcos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica.

Tabela S3. (Continuação)

Marcos Anatômicos - Asa anterior	Veias	Marcos Anatômicos- Asa posterior	Veias
MP1	Medial posterior –Distal	CUA.d	Cubital anterior –Distal
IMP	Medial posterior intercalar – Proximal	-	-
IMP.d	Medial posterior intercalar – Distal	-	-
MP2	Medial posterior 2 – Proximal	-	-
MP2.d	Medial posterior 2 – Distal	-	-
CUA	Cubital anterior – Proximal	-	-
CUA.d	Cubital anterior – Distal	-	-
Icu1	Cubital Intercalar 1 – Proximal	-	-
Icu1.d	Cubital Intercalar 1 – Distal	-	-
Icu2	Cubital Intercalar 2 – Proximal	-	-
CUP	Cubital posterior – Proximal	-	-
CUP1	Cubital posterior – Distal	-	-
А	Anal – Proximal	-	-
A.d	Anal – Distal	-	-

CONCLUSÃO

O presente estudo trouxe novas perspectivas no estudo de Ephemeroptera, especialmente voltados para o incremento de conhecimento para a região Neotropical. O primeiro capítulo trata-se do primeiro estudo de Barcode para famílias brasileiras. O barcode já é uma técnica amplamente utilizada em países da Europa e da América do Norte, inclusive para Ephemeroptera, e carecia para o Brasil minimizar essa lacuna de conhecimento. Agora podemos fornecer um ponto de referência na tomada de decisões sobre distinções em nível de espécie em famílias brasileiras de Ephemeroptera.

O segundo capítulo, por sua vez, também é o primeiro estudo de morfometria geométrica de asas para Ephemeroptera Neotropical. Os organismos apresentam número indefinidamente grande de características potencialmente um quantificáveis, mas na prática apenas um pequeno número de características pode ser estudado, seja com variáveis discretas ou contínuas. A robustez dos padrões evolutivos pode ser avaliada determinando se diferentes conjuntos de características produzem padrões semelhantes. Nosso intuito aqui foi promover uma alternativa para buscar uma ampla cobertura da morfologia das asas de uma subfamília de Ephemeroptera e avaliar sua evolução. Técnicas como a morfometria geométrica estão expandindo o universo de caracteres morfológicos. Esses novos dados estão agora sendo amplamente disseminados por meio de bancos de dados como o MorphoBank e podem ser utilizados para diversos outros estudos. Outro papel importante da morfometria geométrica é minimizar muitas das ambiguidades na análise de caráter discretos (que são fontes erros dos dados morfológicos), e

esses erros podem ser resolvidos simplesmente tratando os caracteres morfológicos como traços quantitativos contínuos.

Além disso, o presente estudo contribui com futuras tomadas de decisões de pesquisadores. Qual técnica devo usar para distinguir as subtribos de Hagenulinae? Se levarmos em conta a subtribo Miroculina ou Hagenulina, a morfometria se mostrou extremamente eficaz para separar seus gêneros. É uma técnica rápida, barata e relativamente simples de se analisar. Mas se olharmos para a subtribo Hermanellina essa técnica já não é tão eficaz para separar os grupos só a partir dos caracteres das asas, e a técnica molecular irá separar muito melhor os gêneros analisados.