



DIVISÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM ENTOMOLOGIA - DIENT



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**SISTEMÁTICA DE *ILYOBIUS* ENDERLEIN, 1910 (MEGALOPTERA: SIALIDAE) E
EFEITOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE SUA DISTRIBUIÇÃO**

GABRIELA CAROLINE MENDES

MANAUS, AMAZONAS

2023

**SISTEMÁTICA DE *ILYOBIUS* ENDERLEIN, 1910 (MEGALOPTERA: SIALIDAE) E
EFEITOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE SUA DISTRIBUIÇÃO.**

GABRIELA CAROLINE MENDES

Orientadora: Dra. Neusa Hamada

Coorientadora: Dra. Jeane Marcelle Cavalcante do Nascimento

Plano de Tese apresentado à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para ingresso no curso de Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

MANAUS, AMAZONAS

2023

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Aspectos gerais da Ordem Megaloptera Latreille, 1802.....	1
1.3 Efeitos das mudanças climáticas sobre a distribuição de <i>Ilyobius</i>	5
2 Justificativa	6
3 Objetivos.....	8
3.1 Objetivo geral.....	8
3.2 Objetivos específicos	8
4 Materiais e Métodos.....	9
4.1 Espécimes utilizados.....	9
4.2 Coletas	10
4.3 Criação em laboratório e associação	10
4.3.1 Imaturos.....	10
4.3.2 Adultos	11
4.4 Taxonomia	11
4.4.1 Preparação do material	11
4.4.2 Identificações	12
4.4.3 Ilustrações.....	12
4.5 Análises filogenéticas	13
4.5.1 Seleção dos táxons	13
4.5.2 Caracteres morfológicos	13
4.5.3 Caracteres moleculares.....	14
4.5.4 Procedimentos analíticos	15
4.6 Modelagem de distribuição de <i>Ilyobius</i>	16
4.6.1 Obtenção de dados de ocorrência de <i>Ilyobius</i>	16
4.6.2 Distribuição potencial de <i>Ilyobius</i>	17
4.6.3 Efeitos das mudanças climáticas na distribuição de <i>Ilyobius</i>	17
4.6.4 Áreas de estabilidade climática.....	18
4.6.5 Modelos de Nicho Ecológico.....	18
5 Cronograma	19
6 Apoio financeiro	20
7 Referências	20

1 Introdução

As mudanças ambientais induzidas por ações humanas estão causando a diminuição da biodiversidade, com previsões alarmantes sobre seus efeitos no futuro (Sala et al. 2000; Beillouin et al. 2021). Estima-se que muitas espécies desaparecerão antes mesmo de serem conhecidas pela ciência (Costello et al. 2013; Habibullah et al. 2022). Buscando prever como as espécies responderão a essas mudanças e propor medidas mitigatórias adequadas, os estudos de conservação estão cada vez mais incorporando modelos preditivos em suas abordagens, como é o caso dos modelos de distribuição das espécies (Franklin et al. 2009, Wood et al. 2018, Guo et al. 2019).

A acuracidade dos modelos preditivos depende da correta identificação do táxon, isso porque diferentes táxons podem diferir em termos de habitat, distribuição e sucesso adaptativo (Mori et al. 2019). A filogenia tem sido amplamente integrada à taxonomia para conceitualização e delimitação de espécies através da combinação de técnicas moleculares modernas e análises de caracteres morfológicos (Wang et al. 2018, Feijó et al. 2019, Petean et al. 2020). O conhecimento detalhado de aspectos taxonômicos e filogenéticos de grupos animais é fundamental para a construção de uma compreensão mais adequada sobre a biodiversidade e distribuição das espécies no planeta, tornando possível o desenvolvimento de ações práticas para proteção das espécies e de seus habitats.

1.1 Aspectos gerais da Ordem Megaloptera Latreille, 1802

Megaloptera é uma ordem de insetos holometábolos e anfibióticos descrita por Latreille em 1802. O grupo possui uma história evolutiva importante por representar, atualmente, uma das linhagens mais antigas dentro de Holometabola, dado que os fósseis mais antigos datam do início do Permiano, há 250 milhões de anos (Winterton et al. 2010, Liu et al. 2012, Zhao et al. 2014; Handlirsch 1920, Ansoerge 2001, Grimaldi e Engel 2005).

Os estudos filogenéticos mais recentes, apoiados em dados morfológicos e moleculares, têm recuperado Megaloptera + Neuroptera (Eidoneuroptera) como grupo-irmão de Raphidioptera, formando a superordem Neuropterida (Aspöck et al. 2001, Aspöck e Aspöck 2008), onde o monofiletismo tem sido repetidamente suportado (Kjer et al. 2006, Wang et al. 2012, Zhao et al. 2014, Engel et al. 2018). Apesar do consenso

atual sobre seu posicionamento filogenético, o monofiletismo de Megaloptera já foi alvo de debates, isso porque o grupo possui características generalizadas dentro de Neuropterida, especialmente nas asas. Além disso, características morfológicas potencialmente sinapomórficas da ordem sofrem reversões entre vários gêneros, e outras representam perdas de caracteres (Winterton et al. 2010, Engel et al. 2018). Apesar disso, as análises filogenéticas modernas recuperam o monofiletismo do grupo, sustentado pelas seguintes características: presença de brânquias laterais no abdômen das larvas; gonocoxito 9 do macho posicionado próximo à base do tergito 9 e presença de sacos eversíveis no gonocoxito 11 no macho (Aspöck et al. 2001, Aspöck e Aspöck 2008, Liu et al. 2016, Winterton et al. 2017).

Megaloptera pode ser diferenciada das demais ordens dentro de Neuropterida pela seguinte combinação de características: adultos com peças bucais prognatas, asa posterior com uma área anal ampla, larvas com brânquias traqueais abdominais e hábito exclusivamente aquático (Theischinger e New 1993, Whiting 1994, Liu et al. 2015a, Wang et al. 2017). Atualmente, a ordem contém 398 espécies e subespécies descritas, agrupadas em duas famílias: Sialidae Leach, 1815 e Corydalidae Leach, 1815 (Rivera-Gasperín et al. 2019). Com base em resultados obtidos por meio de análises filogenômicas estima-se que a divergência entre as duas famílias tenha ocorrido no final do Permiano (Winterton et al., 2017) ou durante o Triássico (Wang et al. 2012), apesar de não existirem registros fósseis para estes períodos (Liu et al. 2015c).

1.2 Sialidae Leach, 1815

Sialidae contém 11 gêneros, com cerca de 87 espécies divididas em duas subfamílias, Sialidinae e Sharasialinae (fóssil) (Liu et al. 2015a). Seis gêneros de Sialidinae ocorrem no Hemisfério Sul: *Austrosialis* Tillyard, 1919, *Caribesialis* Ardila-Camacho, Martins & Contreras-Ramos, 2021, *Haplosialis* Navás, 1927, *Ilyobius* Enderlein, 1910, *Leptosialis* Esben-Petersen, 1920 e *Stenosialis* Tillyard, 1919 (Liu et al. 2015a). *Indosialis* Lestage 1927, *Nipponosialis* Kuwayama, 1962, *Protosialis* Van der Weele, 1909 e *Sialis* Latreille 1802 ocorrem no Hemisfério Norte (Liu et al. 2015a). Destes, apenas *Ilyobius* e o gênero monotípico *Caribesialis* ocorrem na região Neotropical (Liu et al. 2015a).

Os sialídeos neotropicais raramente são observados em campo, sugerindo baixas densidades populacionais e distribuição irregular (Contreras-Ramos 2008). A maioria dos adultos possui hábitos diurnos e não é capturada com frequência em armadilhas luminosas (New e Theischinger 1993). Na Amazônia central, por exemplo, os sialídeos correspondem a apenas cerca de 7,6% da diversidade de larvas de Megaloptera (Azevêdo 2003). A dificuldade na amostragem de larvas e adultos de Sialidae tem sido apontada como o principal motivo do escasso conhecimento sobre a família em comparação com Corydalidae (Contreras-Ramos 2008).

Ilyobius, o gênero-alvo desse estudo, é dos um dos menos estudados em Sialidae. Seus espécimes são raros de serem encontrados em campo, fato que reflete a baixa densidade populacional e baixa frequência de ocorrência deste gênero em comparação com os demais Megaloptera (Contreras-Ramos 2008). O gênero possui 12 espécies viventes consideradas válidas, distribuídas exclusivamente na região Neotropical: *Ilyobius bimaculatus* (Banks, 1920), *Ilyobius brasiliensis* (Navás, 1936), *Ilyobius chilensis* (McLachlan 1871), *Ilyobius curvatus* Liu, Hayashi & Yang, 2015, *Ilyobius erebus* Mendes, Nascimento, Fusari & Hamada, 2022, *Ilyobius flammatus* (Penny, 1981), *Ilyobius flavicollis* (Enderlein, 1910), *Ilyobius hauseri* (Contreras-Ramos, Fiorentin & Urakami, 2005), *Ilyobius mexicanus* (Banks, 1901), *Ilyobius nigrocephalus* Ardila-Camacho, Martins & Contreras-Ramos, 2021, *Ilyobius nubilus* (Navás, 1933) e *Ilyobius ranchograndis* (Contreras-Ramos, 2006).

Ilyobius brasiliensis (Navás, 1936) foi considerada sinônimo-júnior de *I. nubilus* devido às similaridades no padrão de coloração do corpo e formato das asas e por compartilharem a mesma área de distribuição (Contreras-Ramos 2006; Liu et al. 2015a, b). Contudo, a sinonímia de *I. brasiliensis* sob *I. nubilus* não foi corroborada em Mendes (2022, dados não publicados), com base em diferenças no formato da asa anterior, e a revalidação dessa espécie foi proposta. Portanto, *I. brasiliensis* é considerada válida no presente estudo. Seis novas espécies brasileiras de *Ilyobius* foram descritas na dissertação de Pereira (2019, dados não publicados) e três novas espécies foram descritas no trabalho de dissertação de Mendes (2022). O número total de espécies de *Ilyobius* conhecidas até o momento passou para 21, incluindo as nove espécies não publicadas.

Liu et al. (2015) dividiu *Ilyobius* em dois grupos de espécies com base em análises filogenéticas e características morfológicas. O grupo *Ilyobius chilensis* inclui as espécies

I. chilensis, *I. erebus*, *I. hauseri* e *I. nubilus*, sendo o clado sustentado pelas seguintes características da genitália do macho: esternito 9 com uma projeção mediana alongada; ectoproctos em forma de gancho e gonocoxito 11 como uma banda transversa, com processos medianos curtos; e pela condição do gonocoxito 8 da genitália da fêmea, que pode ser reduzido ou fusionado à gonapófise 8 (Liu et al. 2015a, Mendes et al. 2022). O segundo grupo, *Ilyobius mexicanus*, inclui as espécies *I. flammatus*, *I. flavicollis*, *I. mexicanus*, *I. nigrocephalus* e *I. ranchograndis*, sendo esse clado sustentado por características do macho – ectoproctos conectados medianamente por uma região fracamente esclerotizada e um lobo ventral setoso presente no ânus. As fêmeas desse grupo compartilham o esternito 7 com processo tubercular próximo à margem posterior (Liu et al. 2015a). *Ilyobius bimaculatus* e *I. curvatus* foram incluídas no grupo *mexicanus* por apresentarem semelhanças na genitália feminina e no padrão de manchas cefálicas (Liu et al. 2015b).

Os grupos de espécies propostos em Liu *et al.* (2015a) foram recuperados na hipótese filogenética com ênfase no gênero apresentada na dissertação de Mendes utilizando dados morfológicos (2022, dados não publicados). Os clados recuperados foram sustentados por características dos imaturos descritas pela primeira vez para o gênero (*e.g.*, formato da cabeça, proporção entre o comprimento e a largura do labro, presença ou ausência de manchas digitiformes na região posterior da cápsula cefálica). As características larvais utilizadas no estudo foram importantes para o suporte de alguns clados, como, por exemplo, para recuperar o monofiletismo do grupo de espécies *I. chilensis*. As novas características possibilitaram uma maior resolução das relações interespecíficas de *Ilyobius*, evidenciando que essas estruturas podem ser bastante informativas e devem ser abordadas nos estudos filogenéticos sobre o gênero.

Ilyobius é um gênero pouco amostrado, o que reflete em sua baixa representatividade em coleções biológicas e, como consequência, dificulta estudos de qualquer natureza sobre o grupo. Os estudos filogenéticos realizados até o momento se limitaram ao uso de caracteres morfológicos (Liu *et al.* 2015a, Mendes 2022, dados não publicados). Contudo, a associação de dados moleculares com as novas informações morfológicas importantes para a taxonomia de *Ilyobius*, trazidas à tona nos últimos anos, têm grande potencial para elucidar os aspectos evolutivos que podem estar envolvidos nos processos de diversificação do gênero. Dessa forma, a proposta de uma hipótese filogenética para *Ilyobius*, associando dados morfológicos e moleculares, poderá fornecer

resultados robustos, ampliando o conhecimento evolutivo e subsidiando futuras abordagens filogeográficas sobre gênero.

1.3 Efeitos das mudanças climáticas sobre a distribuição de *Ilyobius*

Fatores climáticos exercem um controle dominante sobre a faixa de distribuição das espécies, essa é uma das premissas centrais da biogeografia (Pearson and Dawson 2003). Mudanças ambientais rápidas e intensas estão afetando praticamente todos os ecossistemas da Terra, levando à extinção de espécies e perda de habitats em taxas alarmantes (Barnosky et al. 2011, Silva et al. 2019). Os efeitos conhecidos das mudanças climáticas podem levar tanto à contração da faixa de distribuição, quanto à sua expansão (Walther et al. 2002), por isso, é esperado que as mudanças climáticas previstas (IPCC, 2014) tenham um impacto significativo na faixa de distribuição das espécies (Walther et al. 2002, Pearson e Dawson 2003). Este impacto pode ser estimado a partir de técnicas de modelagem preditiva capazes de fornecer informações sobre áreas de ocorrência prevista da espécie, áreas de estabilidade climática e extensão das áreas de refúgio (Erasmus et al. 2000, Caten et al. 2017).

Os Modelos de Distribuição das Espécies podem gerar previsões sobre a distribuição geográfica das espécies com base em dados bioclimáticos (Pearson and Dawson 2003, Rangel e Loyola 2012). Os pontos de ocorrência da espécie são relacionados com um conjunto de dados que resume as condições favoráveis à sua ocorrência, como tipo de solo, vegetação e clima (Margules e Redhead 1995), que podem ser acessados através do Sistema de Informação Geográfica (GIS). Este conjunto de dados é comparado com as características de áreas mais amplas, onde a ocorrência da espécie de estudo é desconhecida (Soberón 2007, Rödder e Lötters 2010). O resultado dessa abordagem correlativa é a obtenção de semelhanças entre as áreas comparadas e a probabilidade de distribuição potencial (Soberón 2007).

A capacidade de dispersão tem um papel chave na distribuição das espécies frente às alterações ambientais, pois permite a colonização em áreas fora da faixa de distribuição existente (Heilveil e Berlocher 2006). Por isso, espécies com baixas capacidades de dispersão podem ser menos capazes de superar mudanças climáticas rápidas e intensas, sendo particularmente vulneráveis à perda de habitat (Walther et al. 2002, Caten et al. 2017). A modelagem de distribuição pode ser projetada para cenários passados e futuros

para identificar áreas de estabilidade climática (Caten et al. 2017), que podem servir como refúgios ambientais para espécies com baixa capacidade de dispersão, constituindo uma ferramenta útil para seleção de áreas de preservação (Pearson e Dawson 2003, Caten et al. 2017).

Insetos aquáticos são bons modelos para o estudo das mudanças climáticas na faixa de distribuição porque, além de serem sensíveis a mudanças ambientais, variam bastante na sua capacidade de dispersão (Hilsenhoff 1987, Heilveil e Berlocher 2006). Os insetos da ordem Megaloptera são conhecidos por terem baixa vagilidade e possuem uma dispersão bastante limitada (Petersen 1974), sendo, frequentemente, encontrados próximos aos corpos d'água onde se desenvolvem na fase larval (Penny 1981). O fato dos adultos, que são terrestres, terem baixa capacidade de dispersão é um fator de agravamento dos efeitos negativos das mudanças climáticas.

Ilyobius, o gênero alvo desse estudo, é amplamente distribuído na região Neotropical, contudo, suas espécies têm distribuição localizada, com poucos pontos de ocorrência e baixas densidades populacionais, sendo consideradas raras e difíceis de amostrar em estudos de campo (Contreras-Ramos 2008). A dificuldade em amostrar táxons raros prejudica a conservação de espécies e de seus habitats e culmina em pouca compreensão sobre suas distribuições (Lawler et al. 2003). Uma alternativa para a conservação *in situ* de espécies raras é a utilização de táxons indicadores (Lawler et al. 2003), que são, por definição, organismos cujas características (e.g. padrão de distribuição e dispersão) são usadas como um índice para atributos que são muito difíceis ou caros de medir em outros táxons de interesse (Landres et al. 1988, Caro e O'Doherty 1999). Neste sentido, *Ilyobius* poderá servir como um táxon indicador para os efeitos das mudanças climáticas em táxons que compartilham as características relacionadas às baixas dispersão, densidade populacional e frequência de ocorrência. Assim, os modelos eficazes em prever a distribuição de *Ilyobius* poderão ser aplicados em outros táxons com padrões de distribuição similares.

2 Justificativa

As lacunas no conhecimento sobre *Ilyobius* estão presentes em diversas áreas. Apesar de ser um grupo de importância ecológica, uma vez que pode ser utilizado como bioindicador da qualidade da água, a carência de estudos taxonômicos sobre o gênero

torna sua importância subestimada. Trabalhos recentes realizados no Brasil evidenciaram a existência de diversas espécies ainda não descritas no gênero (Pereira 2019, dados não publicados; Mendes 2022, dados não publicados). A descoberta de um número exponencial de espécies e os registros de ocorrência do gênero em alguns estudos ecológicos realizados em diferentes regiões do Brasil indica que o grupo é negligenciado e sua diversidade pode estar sendo subestimada, assim como a amplitude de sua distribuição, e que provavelmente ainda existem muitas espécies a serem descobertas em locais ainda pouco explorados para o grupo, como é o caso da região Nordeste. Neste sentido, dar continuidade a estudos sobre *Ilyobius* é fundamental para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade e distribuição deste gênero.

O fato de *Ilyobius* ser um gênero pouco amostrado reflete sua representatividade em coleções biológicas e, como consequência, dificulta estudos de qualquer natureza sobre o gênero. Estudos filogenéticos realizados até o momento utilizaram apenas a análise de caracteres morfológicos (Liu et al., 2015a, Mendes 2022, dados não publicados). Sabe-se que a sistemática morfológica e a sistemática molecular são ferramentas que, quando integradas, fornecem subsídios para a elaboração de modelos importantes para reconstrução das relações evolutivas, auxiliando na resolução do posicionamento filogenético em artrópodes (Giribet et al. 2001, Montagna et al. 2016, Wang et al. 2017). Além disso, nos últimos anos, análises de sequenciamento gênico têm se tornado mais acessíveis e hoje são importantes ferramentas para estudos evolutivos. Filogenias baseadas em morfologia, quando integradas às análises de dados moleculares, podem ser úteis para inferir padrões de divergência genética entre espécies crípticas ou estreitamente relacionadas (e.g., Nascimento et al. 2018). Portanto, o resultado desse trabalho fornecerá a primeira hipótese filogenética combinando dados morfológicos e moleculares para acessar as relações entre as espécies do gênero, subsidiando futuros estudos evolutivos.

É esperado que os efeitos das mudanças climáticas previstas (IPCC, 2014) causem graves impactos na biodiversidade. A escassez de conhecimento sobre a distribuição das espécies dificulta o desenvolvimento de ações práticas de conservação, sobretudo quando se trata de espécies com baixa capacidade de dispersão, que são vulneráveis à perda de habitat, como é o caso em *Ilyobius*. A modelagem de distribuição permitirá estimar os efeitos das mudanças climáticas na distribuição do gênero e, se os modelos forem eficazes

em suas previsões, a metodologia empregada neste estudo poderá ser aplicada a outros táxons com o mesmo padrão de distribuição. A modelagem também permitirá identificar áreas de estabilidade climática e áreas de refúgio, fornecendo assim subsídios para futuros estudos da biodiversidade, como, por exemplo, a definição de áreas prioritárias para a conservação.

A proteção de táxons mal amostrados é um grande desafio. As dificuldades de amostragem, devido à baixa densidade populacional e a baixa frequência de ocorrência, também prejudicam o conhecimento sobre *Ilyobius*. A modelagem da distribuição desse gênero servirá para prever áreas de aptidão positiva, ou seja, áreas em que as espécies têm maior probabilidade de ocorrer. Isso deverá otimizar o esforço amostral de coletas realizadas para estudar esse táxon e, assim, irá evitar coletas desnecessárias, maximizando os recursos financeiros disponíveis para futuras pesquisas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar um estudo sistemático sobre *Ilyobius* e avaliar os impactos das mudanças climáticas previstas (IPCC, 2014) na sua distribuição.

3.2 Objetivos específicos

- Associar imaturos e adultos através de criação em laboratório.
- Descrever eventuais espécies novas de *Ilyobius* ocorrentes no Brasil.
- Descrever e/ ou redescrever estágios desconhecidos ou com poucas informações morfológicas de espécies descritas.
- Elaborar uma chave dicotômica ilustrada para a identificação das espécies do gênero.
- Testar a hipótese de monofiletismo do gênero e dos grupos de espécies com base em caracteres morfológicos e moleculares.
- Acessar as relações filogenéticas entre as espécies de *Ilyobius* utilizando ferramentas morfológicas e moleculares.
- Identificar áreas previstas para ocorrência de *Ilyobius* através da modelagem de distribuição das espécies.

- Modelar os efeitos das mudanças climáticas previstas na distribuição de *Ilyobius* e identificar áreas de estabilidade climática.

4 Materiais e Métodos

4.1 Espécimes utilizados

Parte do material que será utilizado neste estudo já foi coletada e foi proveniente de coletas realizadas em diversas regiões do Brasil e outros países da América do Sul pela equipe do Laboratório de Citotaxonomia de Insetos Aquáticos (LACIA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), incluindo o material já coletado e presente nos trabalhos de dissertação da Ms. Evelyn Pereira (Pereira, 2019, dados não publicados) e Ms. Gabriela Mendes (Mendes, 2022, dados não publicados). Com o objetivo de ampliar a amostragem de *Ilyobius* e obter material fresco para procedimentos moleculares, serão realizadas coletas em áreas ainda pouco amostradas para o grupo ou em locais com prováveis indícios de ocorrência do gênero (e.g., Acre, Brasília, Ceará, Mato Grosso do Sul e Pará) e nas localidades-tipo das espécies conhecidas de *Ilyobius*, em países como Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, México, Panamá, Peru e Venezuela. Os espécimes utilizados neste estudo serão depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, caso sejam coletados em outros países, os tipos serão depositados em museus no país de origem.

O material-tipo das espécies conhecidas serão solicitados para empréstimo das seguintes instituições: Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, em São Paulo, São Paulo, Brasil (MZUSP); Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (MCNZ) Museu de História Natural Senckenberg, Frankfurt, Alemanha (SNHM); Museu de História Natural do Instituto Smithsonian, Washington, DC, Estados Unidos (NMNH); Departamento de Entomologia, Universidade Texas A & M, College Station, Texas, Estados Unidos (TAMU); Coleção de Artrópodes da Flórida, Gainesville, Flórida, Estados Unidos (FSCA); Museu de Zoologia comparada, Harvard, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos (MCZ); Museu do Instituto de Zoologia Agrícola

“Francisco Fernández Yépez”, Aragua, Venezuela (MIZA); Coleção Nacional de Insetos, Instituto de Biologia, UNAM, Cidade do México, México (UNAM).

4.2 Coletas

No campo, os espécimes adultos serão obtidos através de busca ativa na vegetação às margens dos corpos d’água e por meio de armadilhas Malaise (interceptação de vôo) instaladas sobre os cursos d’água. As larvas serão coletadas com o auxílio de uma rede entomológica aquática (rede “D”) em ambientes lênticos, com sedimento fino, folhiço e raízes. O material coletado será transferido para uma bandeja branca para melhor visualização e triagem dos espécimes. Para o transporte das larvas do campo para o laboratório de criação de insetos aquáticos do INPA, cada espécime será individualizado, a fim de evitar o canibalismo, em um recipiente plástico de 80mL, contendo briófitas e uma fina lâmina d’água, com cerca de 5mm de altura. Para minimizar o estresse fisiológico, as larvas serão mantidas em uma bolsa térmica durante o transporte. As larvas serão criadas em laboratório, sob condições controladas, até a emergência dos adultos.

4.3 Criação em laboratório e associação

4.3.1 Imaturos

A metodologia para criação das larvas sob condições laboratoriais será baseada em Mendes et al. (2022) e na dissertação e tese do Dr. Carlos de Azevêdo (Azevêdo 2003, 2009). As larvas serão mantidas sob condições laboratoriais em uma sala de criação climatizada (22°C a 24°C). Os espécimes serão individualizados em recipientes plásticos com tampa devidamente identificados, com dois compartimentos. Um dos compartimentos terá água na altura de aproximadamente 2 cm de profundidade e briófitas, para prevenir o crescimento de fungos, e o segundo compartimento terá areia limpa úmida. As larvas serão mantidas e alimentadas no compartimento com água, onde serão ofertadas, a cada dois dias, de duas a três larvas de *Chironomus* Meigen, 1803 (Diptera: Chironomidae), que serão obtidas de uma criação de larvas feita no laboratório para essa finalidade.

Como os dois compartimentos são conectados, a larva terá acesso livre ao compartimento com areia para construção de uma câmara pupal para completar sua

metamorfose. Após a larva migrar para a areia, a água será retirada do compartimento para evitar que o adulto recém-emergido caia na água. Os recipientes serão mantidos em uma prateleira e cobertos com uma lona escura para reduzir a luminosidade, simulando o ambiente natural. A manutenção dos recipientes será feita a cada dois dias, quando a água será trocada e as briófitas lavadas.

4.3.2 Adultos

Após emergirem, os adultos serão transferidos para um terrário contendo folhagens, galhos e substrato, onde serão alimentados com uma solução açucarada (Contreras-Ramos 1999, Azevêdo e Hamada 2006) e mantidos até morrerem naturalmente, com isso, poderemos estimar o tempo de vida após a emergência, em condições de laboratório. A larva será associada com seu respectivo adulto, possibilitando sua identificação em nível de espécie. Após a morte dos adultos, uma parte será fixada em álcool 80% e 96% e outra parte será montada em alfinete entomológico e etiquetados para posterior identificação.

4.4 Taxonomia

4.4.1 Preparação do material

Para melhor observação das estruturas internas e externas das genitálias, o abdome será destacado na altura do terceiro segmento com o auxílio de bisturi e pinça, seguindo o procedimento padrão para o grupo (e.g., Contreras-Ramos 1998). A estrutura será clarificada em hidróxido de potássio (KOH) 10%, em banho-maria, por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, a genitália será lavada em água destilada e em álcool 80% para remoção do KOH residual. As homologias e a terminologia das genitálias masculinas e femininas seguirá os trabalhos de Liu et al. (2015a, b, c) e Mendes et al. (2022), enquanto a terminologia para as demais estruturas morfológicas externas dos adultos seguirá New & Theischinger (1993), exceto a terminologia da venação das asas, que seguirá Breitkreuz et al. (2017).

O estágio imaturo será descrito com base em larvas e na exúvia de último estágio. As peças bucais e pernas serão examinadas a partir da exúvia da pupa. Os espécimes serão fixados em álcool 80% e 96% e a terminologia para a morfologia da larva seguirá New & Theischinger (1993).

4.4.2 Identificações

As espécies de *Ilyobius* serão identificadas com o auxílio de literatura especializada contendo as descrições originais, chaves de identificação e redescrições, quando disponíveis (e.g. Contreras-Ramos et al. 2005, Contreras-Ramos 2006, 2008, Liu et al. 2015c, Archangelsky et al. 2017). A identificação é baseada na morfologia e coloração da cabeça e pronoto, e da morfologia das genitálias do macho e fêmea (Contreras-Ramos 2002, Liu et al. 2015b).

As espécies descritas nos trabalhos de Pereira (2019) e Mendes (2022) ainda não foram publicadas e, portanto, não são válidas. Para evitar que nomes não válidos sejam replicados, a nomenclatura foi modificada, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Substituição dos nomes não válidos das espécies de *Ilyobius* Enderlein, 1910 (Megaloptera: Sialidae) descritas em Pereira (2019, dados não publicados) e Mendes (2022, dados não publicados).

Nomenclatura no trabalho original	Nome modificado	Fonte
<i>Ilyobius dactylus</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 1 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius eligmus</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 2 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius ithyus</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 3 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius kolobosus</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 4 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius kyathus</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 5 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius rachius</i>	<i>Ilyobius</i> sp. 6 P.	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius</i> sp. 7	<i>Ilyobius</i> sp. 7 M.	Mendes (2022, dados não publicados)
<i>Ilyobius</i> sp. 8	<i>Ilyobius</i> sp. 8 M.	Mendes (2022, dados não publicados)
<i>Ilyobius</i> sp. 9	<i>Ilyobius</i> sp. 9 M.	Mendes (2022, dados não publicados)

4.4.3 Ilustrações

Caracteres morfológicos serão ilustrados com base em fotografias obtidas com o auxílio de microscópios estereoscópios Leica M165C e Leica DM5500B e câmeras fotográficas DFC420 e DFC295 acopladas. Uma cúpula de iluminação LED será utilizada para melhores condições de iluminação dos espécimes (Kawada e Buffington 2016). Para obter imagens multifocais será feita uma combinação de imagens digitais obtidas através do microscópio óptico e o microscópio estereoscópio utilizando os

programas Helicon Focus® e Leica *Application Suite* V3.4.1 (versão 2009). Quando não for possível uma visualização adequada das estruturas por meio de fotografias, serão elaborados desenhos a partir de fotografias. A vetorização final dos desenhos e das pranchas será feita utilizando os programas Adobe Illustrator® e Adobe Photoshop®.

4.5 Análises filogenéticas

4.5.1 Seleção dos táxons

Para as análises filogenéticas de *Ilyobius* será feito o máximo de esforço possível para incluir todas as espécies atualmente descritas para o gênero (por meio de coleta e solicitação de empréstimo). Para o grupo externo serão utilizados representantes de *Protosialis* e *Sialis*, gêneros considerados tanto morfológicamente similares quanto filogeneticamente relacionado a *Ilyobius* de acordo com última hipótese de filogenia proposta para Sialidae (Liu et al. 2015a). Vale ressaltar que a maioria do material já se encontra armazenada no Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos do INPA, com indivíduos adequadamente conservados para as análises moleculares.

4.5.2 Caracteres morfológicos

Os caracteres morfológicos investigados serão baseados em estruturas importantes para a taxonomia de Sialidae, incluindo aqueles investigados no trabalho de dissertação de Mendes (2022, dados não publicados). Esses caracteres serão propostos baseando-se em dados de literatura (*e.g.*, Contreras-Ramos *et al.* 2005, Contreras-Ramos 2006, 2008, Liu *et al.* 2015c, Archangelsky *et al.* 2017, Pereira 2019, Mendes *et al.* 2022), ou a partir da observação dos espécies durante esse estudo. A princípio os caracteres morfológicos serão baseados principalmente nos adultos machos, devido às lacunas de informações para os demais estágios de desenvolvimento (a maioria das espécies descritas não possuem fêmeas ou larvas associadas).

A matriz morfológica será confeccionada no programa Mesquite versão 3.04 (Maddison e Maddison 2015). Durante essa etapa será priorizada a codificação contingente (Lee e Bryant 1999, Strong e Lipscomb 1999), entretanto, se necessário, uma codificação multiestado será adotada como forma de preservar a diversidade morfológica das espécies a serem analisadas. Nessa etapa os caracteres serão definidos como não aditivos e não ordenados.

4.5.3 Caracteres moleculares

O DNA será extraído utilizando o kit *DNease Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Será utilizado o método não destrutivo, onde os indivíduos serão perfurados para facilitar a ação dos reagentes e, posteriormente, serão encubados em banho-maria a 56°C, na presença de um tampão e proteinase *K*. Esse método preserva a forma dos indivíduos para estudos taxonômicos. Depois de extraído, o DNA será mantido a -20°C e utilizado para as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) com objetivo de amplificar diferentes fragmentos de genes (*e.g.*, COI, 12S, 16S, 28S e CAD). As condições da PCR específica para cada marcador serão baseadas nos protocolos de literatura específica. Após amplificadas, as amostras serão purificadas com enzimas Exonuclease I *Escherichia coli* (EXO I) e Fostatase Alcalina Termo-sensível (FastAP). Para verificar as concentrações do produto amplificado, utilizaremos a visualização em gel de agarose 2%, com auxílio do marcador *Low Mass Ladder*. As amostras amplificadas que possuem concentrações satisfatórias serão enviadas para sequenciamento ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (INPA – Manaus, Amazonas).

O sequenciamento será feito utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1* e os mesmos iniciadores utilizados nas reações da PCR. Depois da etapa de sequenciamento, os produtos serão precipitados com EDTA/Etanol (adaptado de Platt et al. 2007). O sequenciamento será feito em ambas as direções (F e R) com auxílio de um sequenciador automático DNA ABI PRIM 3130xl (Applied Biosystems). As sequências obtidas serão depositadas na base de dados do GenBank® (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

As sequências individuais obtidas a partir dos iniciadores direto (*forward*) e reverso (*reverse*) serão orientadas e editadas no software BioEdit 5.0 (Hall, 1999) e alinhadas no ClustalW implementado nesse programa. As sequências consenso geradas serão comparadas com as sequências do GenBank® com a finalidade de verificar se a sequência corresponderá ao táxon de interesse, região gênica de interesse e se houve ou não contaminação do DNA durante os procedimentos. Para a escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos será utilizado o programa jModeltest 2.1 (Darriba et al. 2012), de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC).

4.5.4 Procedimentos analíticos

Duas abordagens serão utilizadas para as análises filogenéticas desse trabalho: a parcimônia (para os dados morfológicos quando analisados sozinhos) e a inferência bayesiana (para os dados moleculares e para a análise de evidência total).

Parcimônia

O critério da parcimônia será utilizado para a reconstrução das hipóteses filogenéticas baseadas apenas nos dados morfológicos. As buscas heurísticas serão realizadas com o auxílio do programa TNT (*Tree Analysis Using New Technology*) (Goloboff et al. 2008). Essas buscas serão realizadas sob o comando “*Analyse Tradicional Search*”, com 10.000 replicações. Para o processo de permuta de ramos será utilizado o algoritmo *Tree Bisection and Reconnection* (TBR), salvando 100 árvores por réplica com espaço na memória para 10.000 árvores.

As buscas serão realizadas sob duas estratégias: primeiramente utilizando-se a pesagem uniforme dos caracteres (*equal weights*) e, posteriormente, sob pesagem implícita (*implied weighting*), na qual os pesos ideais dos caracteres são avaliados em conjunto com o processo de buscas das árvores (Goloboff *et al.* 2008). Essa última abordagem favorece o sinal filogenético de caracteres que possuem menos homoplasias (Schuh e Brower 2009), produzindo uma hipótese que minimiza a quantidade total de homoplasias dos dados e com maior resolução. Essa estratégia será empregada caso as análises sob pesagem uniforme resultarem em mais de uma topologia. Durante as análises serão testados diferentes valores de K (de 1 a 10) e a escolha da melhor árvore será selecionada de acordo com o maior valor de ajuste (*fit*) total.

O suporte dos ramos do cladograma será calculado utilizando Bremer Absoluto e/ ou Relativo (Bremer 1994). A distribuição dos caracteres na árvore mais parcimoniosa será analisada com o auxílio do programa WinClada (Nixon 2002) e as árvores serão editadas com o auxílio dos programas Adobe Photoshop® e Adobe Illustrator®.

Inferência bayesiana

As análises dos caracteres moleculares de evidência total (morfológico + moleculares combinados) serão realizadas no programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). Essas análises consistirão preferencialmente de duas corridas independentes de 8×10^7 gerações e quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) simultâneas (sendo uma cadeia fria e três cadeias aquecidas) com as árvores sendo amostradas a cada 1000 gerações. A convergência entre as corridas será verificada no próprio MrBayes avaliando a média do desvio padrão dos splits (sendo satisfatório valores menores que 0,01). Além disso, o programa Tracer 1.4 (Rambaut et al. 2014) também será utilizado para verificar a qualidade das corridas e avaliar a convergência dos parâmetros amostrados (assumindo-se valores de ESS > 200 como um bom indicativo de convergência). Após a remoção das árvores obtidas antes da estabilização das análises (burnin de 10%) as árvores finais serão visualizadas e editadas nos programas FigTree 1.2 (Rambaut et al. 2014) e Adobe Photoshop.

4.6 Modelagem de distribuição de *Ilyobius*

4.6.1 Obtenção de dados de ocorrência de *Ilyobius*

Os pontos de ocorrência de *Ilyobius* serão obtidos através da revisão de artigos publicados sobre o gênero (e.g., Contreras-Ramos 2008, Liu et al. 2015b, Ardila-Camacho e Contreras-Ramos 2018), das dissertações de Pereira (2019, dados não publicados) e Mendes (2022, dados não publicados) e de expedições ao campo. Utilizaremos pontos de ocorrência do gênero na Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, México, Panamá, Peru e Venezuela (Tabela 2).

Tabela 2. Lista de espécies de *Ilyobius* (Megaloptera: Sialidae), suas respectivas distribuições e fonte dessas informações.

Espécie	Distribuição	Referências
<i>Ilyobius bimaculatus</i>	Bolívia	Contreras-Ramos (2006)
<i>Ilyobius chilensis</i>	Argentina, Chile	Contreras-Ramos (2008)
<i>Ilyobius curvatus</i>	Colômbia, Panamá	Liu et al. (2015b)
<i>Ilyobius erebus</i>	Brasil	Mendes et al. (2022)
<i>Ilyobius flammatus</i>	Brasil, Peru	Penny (1981); Contreras-Ramos (2008)

<i>Ilyobius flavicollis</i>	Colômbia	Contreras-Ramos (2006)
<i>Ilyobius hauseri</i>	Brasil	Contreras-Ramos et al. (2005)
<i>Ilyobius mexicanus</i>	México	Liu et al. (2015b)
<i>Ilyobius nigrocephalus</i>	Equador	Ardila-Camacho et al. (2021)
<i>Ilyobius nubilus</i>	Brasil	Archangelsky (2017)
<i>Ilyobius ranchograndis</i>	Venezuela	Contreras-Ramos (2006)
<i>Ilyobius sp. 1 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 2 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 3 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 4 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 5 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 6 P.</i>	Brasil	Pereira (2019, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 7 M.</i>	Brasil	Mendes (2022, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 8 M.</i>	Brasil	Mendes (2022, dados não publicados)
<i>Ilyobius sp. 9 M.</i>	Brasil	Mendes (2022, dados não publicados)

4.6.2 Distribuição potencial de *Ilyobius*

Para modelar a distribuição potencial de *Ilyobius* no presente serão utilizadas as 19 variáveis bioclimáticas disponíveis na base de dados worldClim (Hijmans et al., 2005; <http://www.worldclim.org/>). Além disso, uma variável topográfica representando altitude será obtida da base de dados EarthEnv (Amatulli et al. 2018; <http://www.earthenv.org/>) e uma variável representando o tipo de solo será obtida a partir do base de dados FAO (*Food and Agricultural Organization of the United States*; <http://www.fao.org/soils-portal>). Para diminuir a colinearidade entre as variáveis durante a modelagem, será feita uma PCA (*Principal Component Analysis*) sobre as 21 variáveis ambientais, selecionando os primeiros eixos que explicarem 95% da variação no dado.

4.6.3 Efeitos das mudanças climáticas na distribuição de *Ilyobius*

Serão estimados através da modelagem da distribuição projetada para cenários futuros previstos (2070). As variáveis serão obtidas utilizando o worldClim. Para essa análise serão utilizadas as variáveis obtidas a partir do cenário de emissão RCP4.5. Este é um cenário de emissão intermediário, entre os cenários mais otimistas (RCP2.6) e os mais pessimistas (RCP8.0) (Taylor et al., 2012) e, provavelmente, é o mais realista deles.

Os dados climáticos serão derivados de quatro AOGCMs (*Atmosphere-Ocean General Circulation Models*) – *Community Climate System Model* (CCSM), *Centre National de Recherches Météorologiques* (CNRM), *Model for Interdisciplinary Research on Climate* (MIROC) and *Meteorological Research Institute* (MRI). Todas as variáveis climáticas serão obtidas em uma resolução espacial de 2.5 arc min (~4 km²), essa é a resolução em que a modelagem será feita.

4.6.4 Áreas de estabilidade climática

Serão estimadas através da projeção da modelagem de distribuição de *Ilyobius* para cenários passados e futuros previstos. O foco da análise será a variação na estabilidade do habitat ao longo do tempo. A análise será feita utilizando um teste t emparelhado para comparar as áreas de estabilidade climática entre cenários presentes e futuros (Caten et al. 2017). As comparações serão feitas utilizando pacotes estatísticos, com reamostragem aleatória para definir os valores de *p* no software R (v. 3.2.3). Isso possibilitará a identificação de áreas de estabilidade climática (áreas de refúgio), ou seja, as áreas mais importantes para proteção das espécies e para possibilitar a dispersão através de novas áreas dentro das áreas de refúgio (Caten et al. 2017).

4.6.5 Modelos de Nicho Ecológico

Devido à existência de dados de ausência verdadeiros para o gênero *Ilyobius*, serão utilizados somente métodos de modelagem que utilizam dados de presença e ausência. Assim, serão utilizados *Generalized Linear Models* (GLM), *Generalized Additive Models* (GAM) e *Support Vector Machine* (SVM) para modelar a distribuição potencial do grupo no presente e projetá-la para o futuro. Para cada modelo gerado, o conjunto de dados será dividido em dois: 75% das ocorrências serão selecionadas para a calibração do modelo e 25% para testar a habilidade preditiva do modelo, repetindo esse processo de amostragem 50 vezes para cada espécie. Assim, 600 modelos serão obtidos para o gênero através da combinação de três técnicas de modelagem, quatro modelos climáticos e 50 repetições (3 × 4 × 50). Cada um dos modelos terá sua performance avaliada pela *area under the receiver operating characteristic curve* (AUC, Fielding & Bell, 1997). Valores de AUC menores que 0.7 indicarão que os modelos não foram precisos em prever as ocorrências das espécies, enquanto valores maiores que 0.7 indicam uma boa performance dos modelos. Como passo final será utilizada a abordagem *ensemble* (Araújo e New 2007)

para obter a distribuição potencial final do gênero no presente e no futuro. Uma das vantagens dessa abordagem é que ela gera um mapa consenso de distribuição, considerando a performance de cada modelo individualmente, onde modelos que têm performances superiores têm um maior peso no modelo final. Todas as análises de modelagem serão realizadas no software R (R Core Team 2020).

5 Cronograma

ATIVIDADES	2023		2024				2025				2026				2027		
	3º tri	4º tri	1º tri	2º tri	3º tri	4º tri	1º tri	2º tri	3º tri	4º tri	1º tri	2º tri	3º tri	4º tri	1º tri	2º tri	3º tri
Cumprimento de disciplinas			X	X	X	X											
Revisão e atualização bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Solicitação de empréstimos	X	X	X	X	X												
Aula de qualificação					X												
Coletas		X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Visita à Coleções				X	X	X	X	X									
Identificação do material	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Análises morfológicas		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Levantamento de caracteres		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Redescrição das espécies conhecidas e descrição das espécies novas			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Obtenção de fotografias e confecção dos desenhos		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Análises moleculares				X	X	X	X	X	X	X	X						
Análises Filogenética									X	X	X	X	X				
Levantamento dos dados de distribuição		X	X	X	X												
Análises de distribuição potencial						X	X	X	X	X							

Elaboração de chave de identificação														X	X	X	X		
Submissão de artigos para publicação							X				X				X		X		
Redação da Tese			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Defesa da tese																			X

6 Apoio financeiro

Insetos aquáticos na América do Sul: taxonomia integrativa, biologia e ecologia. CNPq processo n. 308970/2019-5. Coordenadora: Neusa Hamada.

Sistemática integrada de insetos aquáticos, com ênfase em Simuliidae (Diptera) na América do Sul. INPA/ MCTIC. Coordenadora: Neusa Hamada.

Insetos Aquáticos nos Biomas Amazônia e Mata Atlântica: Riqueza e Composição de Espécies. Projeto Universal/ CNPq. Coordenadora: Neusa Hamada.

7 Referências

- Amatulli, G.; Domisch, S.; Tuanmu, M.N.; Parmentier, B.; Ranipeta, A.; Malczyk, J.; et al. 2018. Data Descriptor: A suite of global, cross-scale topographic variables for environmental and biodiversity modeling. *Scientific Data* 5: 1–15.
- Ansorge, J. 2001. Dobbertinia reticulata HANDLIRSCH 1920 from the Lower Jurassic of Dobbertin (Mecklenburg/Germany) - The oldest representative of Sialidae (Megaloptera). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie - Monatshefte* 2001: 553–564.
- Araújo, M.B.; New, M. 2007. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 42–47.
- Archangelsky, M.; Pessacq, P.; Berrondo, M. 2017. Description of the larva of *Ilyobius chilensis* (McLachlan) (Megaloptera: Sialidae) and notes on the adult morphology. *Zootaxa* 4318: 177–186.
- Ardila-Camacho, A.; Contreras-Ramos, A. 2018. Order Megaloptera. *Elsevier Inc.*, 217–227p.
- Aspöck, U.; Aspöck, H. 2008. Phylogenetic relevance of the genital sclerites of Neuropterida (Insecta: Holometabola). *Systematic Entomology* 33: 97–127.

- Aspöck, U.; Plant, J.D.; Nemeschkal, H.L. 2001. Cladistic analysis of Neuroptera and their systematic position within Neuropterida (Insecta: Holometabola: Neuropterida: Neuroptera). *Systematic Entomology* 26: 73–86.
- Azevêdo, C. 2009. Taxonomia, bionomia e estrutura da comunidade de larvas de Megaloptera (Insecta) em igarapés nos estados do Amazonas e Roraima, Brasil. *Tese de doutorado*.
- Azevêdo, C.A.S. 2003. Programa integrado de pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais – ppg btrn. *Dissertação de Mestrado*: 3124.
- Azevêdo, C.A.S.; Hamada, N. 2006. Description of last-instar larva of *Corydalus nubilus* Erichson, 1848 (Megaloptera: Corydalidae) and notes on its bionomics. *Zootaxa* 68: 57–68.
- Azevêdo, C.A.S. De; Hamada, N. 2008. Ordem Megaloptera Latreille, 1802 (Arthropoda: Insecta). *Guia on-line de identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo* 1802: 1–12.
- Banks, N. 1901. New Neuropteroid Insects Author (s): Nathan Banks Source : Transactions of the American Entomological Society (1890-), Vol . 22 , No . 3 (Jul . - Sep . , Published by : American Entomological Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/25076648> Y. 22: 313–316.
- Barnosky, A.D.; Matzke, N.; Tomiya, S.; Wogan, G.O.U.; Swartz, B.; Quental, T.B.; et al. 2011. Has the Earth’s sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51–57.
- Beillouin, D., Cardinael, R., Berre, D., Boyer, A., Corbeels, M., Fallot, A., ... & Demenois, J. 2022. A global overview of studies about land management, land-use change, and climate change effects on soil organic carbon. *Global change biology*, 28(4), 1690-1702.
- Caro, T.M.; O’Doherty, G. 1999. On the use of surrogate species in conservation biology. *Conservation Biology* 13: 805–814.
- Caten, C. Ten; Lima-Ribeiro, M. de S.; da Silva, N.J.; Moreno, A.K.; Terribile, L.C. 2017. Evaluating the Effectiveness of Brazilian Protected Areas Under Climate Change: A Case Study of *Micrurus brasiliensis* (Serpentes: Elapidae). *Tropical Conservation Science* 10.
- Contreras-Ramos, A. 1999. Métodos para estudios en Sistemática de Megaloptera (Insecta: Neuropteridia) con base en Morfología. *Dugesiana*.
- Contreras-Ramos, A. 2002. Six new species of dobsonflies from Venezuela

- (Megaloptera: Corydalidae: Corydalinae). *Aquatic Insects* 24: 55–75.
- Contreras-Ramos, A., Fiorentin, G. L., & Urakami, Y. 2005. A new species of alderfly (Megaloptera: Sialidae) from Rio Grande do Sul, Brazil. *Amazoniana*, 18(314), 267-272.
- Contreras-Ramos, A. 2006. *Protosialis ranchograndis*, a new species of alderfly from Venezuela, with a redescription of *P. brasiliensis* Navás (Megaloptera: Sialidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 108: 977–984.
- Contreras-Ramos, A. 2008. Note on some Neotropical alderflies (Sialidae: Megaloptera). *Annals of the Entomological Society of America* 101: 808–814.
- Contreras-Ramos, A.; Harris, S.C. 1998. The immature stages of *Platyneuromus* (Corydalidae), with a key to the genera of larval Megaloptera of Mexico. *Journal of the North American Benthological Society* 17: 489–517.
- Costello, M.J.; May, R.M.; Stork, N.E. 2013. Can we name earth's species before they go extinct? *Science* 339: 413–416.
- Engel, M.S.; Winterton, S.L.; Breitkreuz, L.C.V. 2018. Phylogeny and Evolution of Neuropterida: Where Have Wings of Lace Taken Us? *Annual Review of Entomology* 63: 531–551.
- Erasmus, B.F.N.; Kshatriya, M.; Mansell, M.W.; Chown, S.L.; Van Jaarsveld, A.S. 2000. A modelling approach to antlion (Neuroptera: Myrmeleontidae) distribution patterns. *African Entomology* 8: 157–168.
- Feijó, A.; Vilela, J.F.; Cheng, J.; Schetino, M.A.A.; Coimbra, R.T.F.; Bonvicino, C.R.; et al. 2019. Phylogeny and molecular species delimitation of long-nosed armadillos (Dasypus: Cingulata) supports morphology-based taxonomy. *Zoological Journal of the Linnean Society* 186: 813–825.
- Fielding, A. H., & Bell, J. F. 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental conservation*, 38-49.
- Franklin, J.; Wejnert, K.E.; Hathaway, S.A.; Rochester, C.J.; Fisher, R.N. 2009. Effect of species rarity on the accuracy of species distribution models for reptiles and amphibians in southern California. *Diversity and Distributions* 15: 167–177.
- Giribet, G.; Edgecombe, G.D.; Wheeler, W.C. 2001. Arthropod phylogeny based on eight loci. *Nature* 413: 157–161.
- Goloboff, P.A.; Farris, J.S.; Nixon, K.C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic

- analysis. *Plant systematics and evolution = Entwicklungsgeschichte und Systematik der Pflanzen* 301: 774–786.
- Grimaldi, D.; Engel, M. s. 2005. *Evolution of the Insects*. Vol. 90.588–588p.
- Guo, J.L.; Yu, Y.H.; Zhang, J.W.; Li, Z.M.; Zhang, Y.H.; Volis, S. 2019. Conservation strategy for aquatic plants: endangered *Ottelia acuminata* (Hydrocharitaceae) as a case study. *Biodiversity and Conservation* 28: 1533–1548.
- Habibullah, M. S., Din, B. H., Tan, S. H., & Zahid, H. 2022. Impact of climate change on biodiversity loss: global evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(1), 1073-1086.
- Handlirsch, A. 1920. Kapitel 7. Palaeontologie. *Handbuch der Entomologie*, 3, 117-304.
- Hilsenhoff, W.L. 1987. An improved biotic index of organic stream pollution. *Great Lakes Entomologist* 20: 31–40.
- Kawada, R.; Buffington, M.L. 2016. A scalable and modular dome illumination system for scientific microphotography on a budget. *PLoS ONE* 11: 1–20.
- Kjer, K.M.; Carle, F.L.; Litman, J.; Ware, J. 2006. A molecular phylogeny of Hexapoda. *Arthropod Systematics and Phylogeny* 64: 35–44.
- Landres, P.B.; Verner, J.; Thomas, J.W. 1988. Ecological Uses of Vertebrate Indicator Species: A Critique. *Conservation Biology* 2: 316–328.
- Lawler, J.J.; White, D.; Sifneos, J.C.; Master, L.L. 2003. Rare species and the use of indicator groups for conservation planning. *Conservation Biology* 17: 875–882.
- Lee, D.C.; Bryant, H.N. 1999. A reconsideration of the coding of inapplicable characters: Assumptions and problems. *Cladistics* 15: 373–378.
- Liu, X.; Hayashi, F.; Yang, D. 2015a. Phylogeny of the family Sialidae (Insecta: Megaloptera) inferred from morphological data, with implications for generic classification and historical biogeography. *Cladistics* 31: 18–49.
- Liu, X.; Hayashi, F.; Yang, D. 2015b. *Sialis primitivus* sp. Nov. (Megaloptera: Sialidae), a remarkable new alderfly species from China. *Zootaxa* 4033: 593–599.
- Liu, X.; Hayashi, F.; Yang, D. 2015c. Taxonomic notes of the neotropical alderfly genus *Ilyobius* enderlein, 1910 (Megaloptera, Sialidae), with description of a new species. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 62: 55–63.
- Liu, X.; Wang, Y.; Shih, C.; Ren, D.; Yang, D. 2012. Early evolution and historical biogeography of fishflies (megaloptera: Chauliodinae): Implications from a phylogeny combining fossil and extant taxa. *PLoS ONE* 7: 1–12.

- Liu, X.; Lü, Y.; Aspöck, H.; Yang, D.; Aspöck, U. 2016. Homology of the genital sclerites of Megaloptera (Insecta: Neuropterida) and their phylogenetic relevance. *Systematic Entomology* 41: 256–286.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. 2015.
- Margules, C. R., & Redhead, T. D. 1995. BioRap: guidelines for using the biorap methodology and tools.
- Montagna, M.; Mereghetti, V.; Lencioni, V.; Rossaro, B. 2016. Integrated taxonomy and DNA barcoding of alpine midges (Diptera: Chironomidae). *PLoS ONE* 11: 1–20.
- Mori, E.; Menchetti, M.; Zozzoli, R.; Milanesi, P. 2019. The importance of taxonomy in species distribution models at a global scale: the case of an overlooked alien squirrel facing taxonomic revision. *Journal of Zoology* 307: 43–52.
- Do Nascimento, J.M.C.; Hamada, N.; Andrade-Souza, V.; Adler, P.H. 2018. A New Anthropophilic Species of *Simulium* (Trichodagmia) (Diptera: Simuliidae) from Amazonia: Morphology, Chromosomes, and DNA Sequences. *Journal of Medical Entomology* 55: 90–111.
- Navás, L. 1933. Décadas de insectos nuevos. Década 24. *Neurópteros. Brotéria, (Ciências naturais)*, 29, 101-110.
- Nixon, K. C. 2002. WinClada, version 1.00. 08. *Published by the author*, Ithaca, NY, 734-745.
- Pearson, R.G.; Dawson, T.P. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global ecology and biogeography*: 548–549.
- Penny, N.D. 1983. Neuroptera of the Amazon Basin Part 9. Albardiinae. *Acta Amazonica* 13: 697–699.
- Pereira, E.B. 2019. Taxonomia e biologia de *Ilyobius* Enderlein, 1910 (Megaloptera: Sialidae) no Brasil. 1910.
- Petean, F.F.; Naylor, G.J.P.; Lima, S.M.Q. 2020. Integrative taxonomy identifies a new stingray species of the genus *Hypanus* Rafinesque, 1818 (Dasyatidae, Myliobatiformes), from the Tropical Southwestern Atlantic. *Journal of Fish Biology* 97: 1120–1142.
- Petersen, R.C. 1974. Life history and bionomics of *Nigronia serricornis* (Megaloptera:

Corydalidae). *PhD dissertation*.

- Platt, A.R.; Woodhall, R.W.; George, A.L. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43: 58–62.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J. (2015). Tracer v1. 6. 2014.
- Rangel, T. F., & Loyola, R. D. 2012. Labeling ecological niche models. *Nat Conserv* 10: 119–126.
- Rivera-Gasperín, S.L.; Ardila-Camacho, A.; Contreras-Ramos, A. 2019. Bionomics and ecological services of Megaloptera larvae (Dobsonflies, Fishflies, Alderflies). *Insects* 10: 1–14.
- Rödger, D.; Lötters, S. 2010. Explanative power of variables used in species distribution modelling: An issue of general model transferability or niche shift in the invasive Greenhouse frog (*Eleutherodactylus planirostris*). *Naturwissenschaften* 97: 781–796.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sala, O.E.; Chapin, F.S.; Armesto, J.J.; Berlow, E.; Bloomfield, J.; Dirzo, R.; et al. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770–1774.
- Silva, D.P.; Andrade, A.F.A.; Oliveira, J.P.J.; Morais, D.M.; Vieira, J.E.A.; Engel, M.S. 2019. Current and future ranges of an elusive North American insect using species distribution models. *Journal of Insect Conservation* 23: 175–186.
- Soberón, J. 2007. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters* 10: 1115–1123.
- Strong, E.E.; Lipscomb, D. 1999. Character coding and inapplicable data. *Cladistics* 15: 363–371.
- Team, R. C. 2020. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna* (2019).
- Theischinger, G., & New, T. R. 1993. Megaloptera (alderflies, dobsonflies). *Walter de Gruyter*.
- Walther, G.; Post, E.; Convey, P.; Menzel, A.; Parmesan, C.; Beebee, T.J.C.; et al. 2002. Ecological response to recent climate change. *Nature* 416: 389–395.
- Wang, P.M.; Liu, X. Bin; Dai, Y.C.; Horak, E.; Steffen, K.; Yang, Z.L. 2018.

- Phylogeny and species delimitation of Flammulina: taxonomic status of winter mushroom in East Asia and a new European species identified using an integrated approach. *Mycological Progress* 17: 1013–1030.
- Wang, Y.; Dietrich, C.H.; Zhang, Y. 2017. Phylogeny and historical biogeography of leafhopper subfamily Evacanthinae (Hemiptera: Cicadellidae) based on morphological and molecular data. *Scientific Reports* 7: 1–13.
- Wang, Y.; Liu, X.; Winterton, S.L.; Yang, D. 2012. The First Mitochondrial Genome for the Fishfly Subfamily Chauliodinae and Implications for the Higher Phylogeny of Megaloptera. *PLoS ONE* 7.
- van Der Waele, H.W. 1909. New genera and species of Megaloptera Latr. *Notes from the Leyden Museum*.
- Whiting, M.F. 1994. Cladistic analysis of the alderflies of America north of Mexico (Megaloptera: Sialidae). *Systematic Entomology* 19: 77–91.
- Winterton, S.L.; Hardy, N.B.; Wiegmann, B.M. 2010. On wings of lace: Phylogeny and Bayesian divergence time estimates of Neuropterida (Insecta) based on morphological and molecular data. *Systematic Entomology* 35: 349–378.
- Wood, K.A.; Stillman, R.A.; Hilton, M.G. 2018. Conservation in a changing world needs predictive models. *Animal Conservation*: 1–8.
- Zhao, C.; Liu, X.; Yang, D. 2014. Wing base structural data support the sister relationship of Megaloptera and Neuroptera (Insecta: Neuropterida). *PLoS ONE* 9.