UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estudo das táticas reprodutivas em duas espécies de Coenagrionidae (Odonata:
Zygoptera)”.

Diogo Silva Vilela

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estudo das táticas reprodutivas em duas espécies de Coenagrionidae (Odonata:
Zygoptera)”.

Diogo Silva Vilela

Orientador: Kleber Del Claro

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a primeiramente à minha família, fonte infinita de apoio e que ajuda a tornar menos penosos os desafios impostos diariamente pela vida. Sem o apoio de meus pais, tios, primos e avós, eu certamente não teria chegado tão longe. Dedico a meus mestres, Kleber e Rhainer que sempre me foram de grande ajuda e paciência, quando necessitei. Finalmente, dedico este trabalho de mestrado à companhia e apoio incondicionais de Thaína Azevedo, que sempre se prontificou a ajudar, ouvir e aconselhar. À todos vocês, dedico!

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Kleber Del Claro com quem trabalho desde a graduação pela orientação e por confiar em meu trabalho. Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Entomologia da Universidade de São Paulo, às secretárias Renata e Vera pela prontidão e atenção sempre despendidas. Agradeço ao CNPq, por ter concedido uma bolsa por todo o período deste mestrado.

Agradeço, imensamente, ao Dr. Rhainer Guillermo por todos esses anos de orientação, trabalhos e amizade. Nada poderei fazer para recompensar todo o ganho profissional e humano que adquiri pelos seus ensinamentos. Muito obrigado, meu amigo-mestre!

Agradeço a todos meus colegas que compartilham desta escolha em seguir o caminho da academia, pelos conselhos, companhias em campo e companheirismo: Eduardo Calixto, Bruno Lopes, Fernando Ancco, Rodrigo Rodrigues.

Agradeço também à minha família em Uberlândia: Thaína (e Arya), Thiago, Thamiris, Joaquim (e Bob), por sempre me lembrarem que não estou só nesta caminhada, e mesmo às vezes se sentindo longe de casa estamos juntos!

Agradeço também aos professores Adolfo Cordero Rivera da Universidade de Vigo por valiosos comentários no primeiro Capítulo desta dissertação e o professor Martín Serrano Meneses da Universidad Autónoma de Tlaxcala por auxílio nas análises de agilidade das asas no segundo Capítulo.

Resumo

Nos estudos sobre a teoria da Seleção Sexual, as libélulas têm sido amplamente estudadas devido à grande variedade de padrões comportamentais, de coloração e táticas reprodutivas. Como forma de demonstrar táticas reprodutivas adotadas por duas espécies de libélulas, esta dissertação teve como objetivos principais: i) investigar o papel de traços secundários como a coloração corporal na competição intra-sexual de uma espécie territorial e ii) analisar se os traços corporais como tamanho e morfologia das asas predizem a tática de acasalamento adotada por machos de uma espécie não-territorial. Sugere-se que a coloração corporal pode prever o resultado de lutas e também se correlacionar positivamente com a condição física dos machos territoriais de *Tigriagrion aurantinigrum*. Ademais, traços corporais como o tamanho e a morfologia das asas influenciam na tática reprodutiva utilizada por machos não-territoriais de *Epipleoneura williamsoni*. Portanto, com os resultados obtidos, conclui-se que a variação nos sinais visuais exerce um papel essencial na comunicação animal e na resolução de conflitos, indicando ainda que pode haver uma sinalização da condição física dos machos. Além disso, os resultados mostraram evidências de como diferentes táticas reprodutivas se relacionam com traços corporais como agilidade e tamanho corporal, os quais podem influenciar no sucesso reprodutivo dos indivíduos.

Palavras-chave: Seleção Sexual, agilidade, “*honest signals*”, coloração corporal, “*handicap*”

Abstract

In studies concerning Sexual Selection theory, dragonflies and damselflies have been well studied due to their wide range of behavioral, color and reproductive tactics patterns. To demonstrate reproductive tactics adopted by two damselfly species, this study aimed to: i) investigate the role of secondary traits such as body coloration in intrasexual competition of a territorial species and ii) analyze if body traits such as size and wing morphology predicts the adopted tactic by non-territorial males. It is suggested that body coloration can predict the fight outcome and also positively correlates with males physical condition in territorial males of *Tigriagrion aurantinigrum* and body traits such as body size and wing morphology influence the reproductive tactic adopted by non-territorial males of *Epipleoneura williamsoni*. Therefore, with these results, it is concluded that the visual signalling variation plays an important role on the animal communication and conflict resolution, which also may indicate that there is a signalling on the males physical condition. Furthermore, the results showed evidence in how different reproductive tactics are related to body traits such as agility and size, which can influence on individuals reproductive success.

Keywords: Sexual Selection, agility, honest signals, body coloration, handicap

Sumário

1	Introdução geral	1
1.1	Referências bibliográficas	6
2	Capítulo I - Pintura facial de guerra: sinais visuais influenciam o resultado de disputas territoriais na libélula-tigre	11
2.1	Resumo	11
2.2	Abstract	12
2.3	Introdução	13
2.4	Material e métodos	16
2.5	Resultados	22
2.6	Discussão	26
2.7	Referências bibliográficas	31
3	Capítulo II - Táticas alternativas de acasalamento em <i>Epipleoneura williamsoni</i>, Santos 1957 (Coenagrionidae: Protoneurinae)	39
3.1	Resumo	39
3.2	Abstract	40
3.3	Introdução	41
3.4	Material e métodos	45
3.5	Resultados	49
3.6	Discussão	53
3.7	Referências bibliográficas	57

Lista de figuras

Figura 1	Cabeças de dois machos de <i>T. aurantinigrum</i> (a, b) com diferenças visíveis na quantidade de pigmentação laranja na região pós-ocular (c, d). Regiões cobertas por pigmentação preta da região pós-ocular que foram subtraídas para a obtenção da área coberta por pigmentação laranja (e, f).	18
Figura 2	Amostras contendo as cabeças de <i>T. aurantinigrum</i> (a); e o controle negativo (b) antes da adição do solvente orgânico.	20
Figura 3	Representação do movimento de face-off realizado pelos machos no momento das disputas territoriais (a); Regressão simples mostrando a diferença na quantidade de pigmentação pós-ocular em machos vencedores e perdedores (b); Regressão simples mostrando a correlação positiva entre a pigmentação pós-ocular e o tamanho coporal (c) e massa (d).	23
Figura 4	A: Amostras contendo o controle negativo (1); e as cabeças de <i>T. aurantinigrum</i> (2); após da adição do solvente orgânico, mostrando que a fase superior permaneceu incolor. B: Tubo de ensaio contendo amostras da região pós-ocular de <i>T. aurantinigrum</i> (1) e outro tubo sem amostras como controle (2), mostrando claramente as fases apolar superior e polar inferior das soluções. A porção polar da solução se coloriu com o pigmento presente no tecido dos machos, indicando a presença de pteridinas	25
Figura 5	Riacho presente na reserva do CCPIU, onde foi realizado o trabalho.	45
Figura 6	Pontos do transecto delimitado no riacho, mostrando as marcações a 25 (a), 50 (b) e 100 metros (c). Estacas foram colocadas a cada 25 metros, e as demais marcações foram feitas com fitas amarradas à vegetação marginal.	47
Figura 7	Diferença de tamanho corporal entre os machos que adotaram as táticas <i>percher</i> e <i>flier</i> . O tamanho dos <i>fliers</i> foi significativamente maior comparado aos <i>perchers</i> .	49
Figura 8	Correlação entre a distância de deslocamento de voo dos machos com o tamanho. O tamanho corporal foi positivamente correlacionado com o deslocamento de voo dos machos.	50

Figura 9 Regressão múltipla mostrando a relação negativa entre o tamanho corporal dos machos e o coeficiente de agilidade $r^2(S)$, indicando que machos maiores possuem maior manobrabilidade de voo. **51**

Lista de tabelas

Tabela 1	Resultados do Modelo Linear Generalizado Binomial (GLM) mostrando a relação entre os traços corporais dos machos (tamanho, massa e pigmentação) com o resultado das lutas. Resultados significativos em negrito.	24
Tabela 2	Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLM) mostrando a relação entre as táticas reprodutivas adotadas pelos machos (<i>percher</i> e <i>flier</i>) com os traços corporais. Resultados significativos em negrito.	52

1. Introdução Geral

A teoria da Seleção Sexual, como postulado por Darwin (1871), é um caso de Seleção Natural onde características corporais presentes nos organismos, como órgãos sensoriais, locomotores ou padrões de coloração, são selecionadas por lhes oferecerem vantagem na competição sexual sobre outros, permitindo a esses organismos transmitir essa vantagem à sua prole. A Seleção Sexual atua sobre os sexos que competem pelo acesso a potenciais parceiros reprodutivos, e pode ser tanto de origem poligínica quanto poliândrica (Smith, 1984). Em espécies poligínicas, onde machos competem entre si pelo acesso às fêmeas ou aos recursos que as atraem, diversas características como maior tamanho de chifres (Preston *et al.* 2003), chamados auditivos de reprodução (Bertram, 2002) e sinais visuais (Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2011) são determinantes tanto na defesa de recursos quanto na escolha das parceiras.

Essas características, como proposto pela teoria da Seleção Sexual, não estão diretamente ligadas ao ato de se reproduzir, mas são tidas como traços diferenciais que indivíduos apresentam e que estão relacionados com o seu sucesso reprodutivo (Darwin, 1871). Tais características são definidas como caracteres sexuais secundários, ou seja, atributos fenotípicos exibidos pelos animais que desempenham um importante papel na competição por recursos, desde os estágios pré-reprodutivos até a fase adulta (Alcock, 1993). Na fase adulta, características corporais como a coloração e estruturas morfológicas podem determinar o resultado da competição por territórios e lutas pelo acesso às fêmeas, e características como o tamanho e a condição física apresentada pelos indivíduos estão correlacionados diretamente com as táticas reprodutivas que apresentam (Oliveira *et al.* 2008; Taborsky *et al.* 2008). Táticas reprodutivas apresentadas pelos indivíduos, como a territorialidade e a não-territorialidade, são

frequentemente relacionados com o seu status físico, sendo consideradas táticas dependentes da condição fisiológica do animal (Brockmann e Taborsky, 2008). A condição corporal é um fator de grande importância para indivíduos que competem por recursos essenciais ao seu sucesso reprodutivo, como territórios e acesso às fêmeas e por frequentemente se envolverem em combates (Wolf e Waltz, 1993; Córdoba-Aguilar e González-Tokman, 2014).

Também relacionadas com a condição corporal dos indivíduos, as táticas alternativas de reprodução (*alternative mating tactics*, AMT, Waltz, 1982) são apresentadas por diversos animais em resposta a um dado fator fisiológico ou ambiental que pode afetar seu sucesso reprodutivo (Oliveira *et al.* 2008). Por exemplo, machos com grandes quantidades de gordura e massa muscular conseguem defender territórios expulsando intrusos, enquanto outros têm de assumir uma tática não-territorial para ter acesso às fêmeas, devido às suas restrições físico-fisiológicas (Forsyth e Montgomerie, 1987; Raihani *et al.* 2008).

Libélulas têm sido amplamente utilizadas como modelos em estudos que envolvem a teoria da Seleção Sexual, pois apresentam uma grande variedade de padrões comportamentais, de cores e táticas reprodutivas (Corbet, 1980, 1999; Garrison, 2006; Córdoba-Aguilar, 2008). Esses padrões comportamentais compreendem desde defesa territorial, onde machos guardam um território à margem de corpos d'água, geralmente utilizados para oviposição pelas fêmeas (Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2011; Córdoba-Aguilar e González-Tókmán, 2014), exibição de ornamentos visuais em repertórios de corte e lutas (Guillermo-Ferreira e Bispo, 2012; Guillermo-Ferreira *et al.* 2014), até a guarda das fêmeas no momento da oviposição, para evitar o assédio de outros machos e a garantia do sucesso reprodutivo (Waage, 1979; Corbet, 1999).

A territorialidade é presente em diversas espécies de Odonata, onde machos passam boa parte de sua vida adulta defendendo territórios nas margens de corpos d'água onde potencialmente podem conseguir cópulas (Corbet, 1999). Para garantir o território, machos constantemente têm de se envolver em encontros agonísticos com conspecíficos (Suhonen *et al.* 2008). Por outro lado, existem espécies não-territoriais nas quais os machos não guardam territórios, e ao invés disso, adotam táticas de acasalamento distintas, como a busca ativa por territórios de outros machos, para encontrar fêmeas e copular (Oliveira *et al.* 2008). Em ambos os casos, territorialidade e não-territorialidade, características corporais podem influenciar na tática apresentada pelos indivíduos e consequentemente no sucesso reprodutivo dos machos de Odonata (Serrano-Meneses, 2008).

Caracteres secundários, como a coloração, são exemplos de traços corporais utilizados em Odonata como critérios de seleção sexual entre machos e fêmeas (Córdoba-Aguilar, 2002). Por exemplo, as asas coloridas de calopterigídeos são utilizadas tanto em elaborados displays na corte pré-cópula, quanto em lutas territoriais onde machos avaliam a condição física do oponente (Guillermo-Ferreira e Bispo, 2012; Guillermo-Ferreira *et al.* 2015). Por sua vez, em Coenagrionidae, onde machos quase sempre tem asas hialinas, a coloração do corpo é importante para o reconhecimento sexual (Gorb, 1997; Fincke *et al.* 1997, 2007; Miller e Fincke, 2004). Padrões de coloração são também frequentemente relacionados a honestidade da sinalização, uma vez que estes sinais são testados constantemente em lutas (Szamadó, 2011), como proposto pela teoria dos Sinais Honestos (Zahavi, 1975, 1977). Essa teoria propõe que os custos impostos pela sinalização honesta seriam mecanismos contra a falsa sinalização entre competidores e parceiros sexuais. Por exemplo, machos com manchas de coloração maiores são tidos como mais propensos a serem vitoriosos em combates, pois estas manchas podem ser indicadores de sua boa

condição física, representada por maiores quantidades de gordura e massa muscular (Serrano-Meneses, 2008; Szamadó, 2011). Em contrapartida, caso um indivíduo com menores capacidades energéticas, como a gordura corporal, alocar esse recurso em um sinal visual, como maiores manchas nas asas, ele terá um sinal falso, pois não terá bom desempenho em lutas e defesa territorial, pois esse recurso já foi utilizado na sinalização.

Por sua vez, características fenotípicas também podem afetar o sucesso reprodutivo em espécies não territoriais, onde machos da mesma população, com condições físicas distintas, podem exibir táticas alternativas de acasalamento (“*alternative mating tactics*”, AMT, Waltz, 1982) para alcançar um objetivo comum: a obtenção de cópulas (Oliveira *et al.* 2008; Taborsky *et al.* 2008). Estes comportamentos alternativos são frequentemente relacionados a caracteres corporais como a coloração, estruturas morfológicas presentes no corpo e também o tamanho corporal (Oliveira *et al.* 2008). Além da condição corporal, outros fatores como a densidade populacional (Cordero-Rivera, 1999; Córdoba-Aguilar e Cordero-Rivera, 2005), idade (Forsyth e Montgomerie, 1987) e a frequência fenotípica (Taborsky e Brockmann, 2010) podem determinar a AMT nos machos e conseqüentemente afetar o seu sucesso reprodutivo.

Portanto, os dois capítulos dessa dissertação buscaram estudar as táticas reprodutivas adotadas por libélulas territoriais e não-territoriais e avaliar os traços corporais que podem influenciar na resolução de conflitos e na tática apresentada por machos. Cada um dos capítulos foi realizado com uma espécie diferente: I) *Tigriagrion aurantinigrum* Calvert 1909 e II) *Epipleoneura williamsoni* Santos 1957.

Os objetivos específicos dessa dissertação foram:

1) Investigar se a coloração facial é selecionada via competição intra-sexual em machos de uma espécie territorial e avaliar se esta coloração facial é capaz de prever o resultado de lutas territoriais e a qualidade dos territórios defendidos pelos machos;

2) Testar se a pigmentação facial é dependente da condição física e, consequentemente, correlacionada positivamente com tamanho e massa corporal;

3) Investigar se a característica química do pigmento é derivada de pteridina ou carotenóides, uma vez que essa caracterização pode indicar os custos de se obter ou sintetizar o sinal visual.

4) Analisar se traços corporais, como o tamanho e a morfologia das asas, podem prever a tática reprodutiva adotada por machos de uma espécie não-territorial;

1.1 Referências bibliográficas

Brockmann H. J., Taborsky, M. (2008). Alternative reproductive tactics and the evolution of alternative allocation phenotypes. Em: Oliveira R.F., Taborsky M., Brockmann H.J. Alternative reproductive tactics: an integrated approach. Cambridge University Press, p. 25-51.

Corbet, P. S. (1980). Biology of odonata. Annual review of entomology, 25(1), 189-217.

Corbet, P. S. (1999). Dragonflies: behaviour and ecology of Odonata. Harley Books.

Cordero, A. (1999). Forced copulations and female contact guarding at a high male density in a calopterygid damselfly. Journal of Insect Behavior 12, 27–37.

Córdoba-Aguilar A. (2002). Wing pigmentation in territorial male damselflies, *Calopteryx haemorrhoidalis*: a possible relation to sexual selection. Animal Behaviour, 63:759-766.doi:10.1006/anbe.2001.1974

Córdoba-Aguilar, A., e Cordero-Rivera, A. (2005). Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. Neotropical Entomology, 34(6), 861-879.

Córdoba-Aguilar, A. (Ed.). (2008). Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press.

Córdoba-Aguilar, A., González-Tokman, D. M. (2014). The Behavioral and Physiological Ecology of Adult Rubyspot Damselflies (*Hetaerina*, Calopterygidae, Odonata). *Advances in the Study of Behavior*, 46, 311-341.

Fincke, O. M., Waage, J. K., e Koenig, W. D. (1997). Natural and sexual selection components of odonate mating patterns. The evolution of mating systems in insects and arachnids, 58, 74.

Fincke, O. M., Fargevieille, A., e Schultz, T. D. (2007). Lack of innate preference for morph and species identity in mate-searching *Enallagma* damselflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(7), 1121-1131.

Forsyth, A., Montgomerie, R. D. (1987). Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly *Calopteryx maculata*: sneaking by older males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(2), 73-81.

Garrison, R. W., von Ellenrieder, N., e Louton, J. A. (2006). *Dragonfly genera of the New World: an illustrated and annotated key to the Anisoptera*. JHU Press.

Gorb, S. N. (1998). Visual cues in mate recognition by males of the damselfly, *Coenagrion puella* (L.)(Odonata: Coenagrionidae). *Journal of Insect Behavior*, 11(1), 73-92.

Guillermo-Ferreira R, Del-Claro K. (2011). Resource defense polygyny by *Hetaerina rosea* Selys (Odonata: Calopterygidae): influence of age and wing pigmentation. *Neotrop Entomol.* 40: 78–84. doi:10.1590/S1519-566X2011000100011

Guillermo-Ferreira, R., e Bispo, P. C. (2012). Male and female interactions during courtship of the Neotropical damselfly *Mnesarete pudica* (Odonata: Calopterygidae). *Acta ethologica*, 15(2), 173-178.

Guillermo-Ferreira R, Gorb SN, Appel E, Kovalev A, Bispo PC. (2015). Variable assessment of wing colouration in aerial contests of the red-winged damselfly *Mnesarete pudica* (Zygoptera, Calopterygidae). *Science of Nature.*; 102. doi:10.1007/s00114-015-1261-z

Miller, M. N., Fincke, O. M. (2004). Mistakes in sexual recognition among sympatric Zygoptera vary with time of day and color morphism (Odonata: Coenagrionidae). *International Journal of Odonatology*, 7(3), 471-491.

Oliveira RF, Taborsky M, Brockmann HJ (2008) Alternative reproductive tactics an integrated approach. Cambridge University Press, pp. 519.

Rantala, M. J., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K., e Suhonen, J. (2000). Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1460), 2453-2457

Raihani, G., Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A. (2008). Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Animal Behaviour*, 75(6), 1851-1860.

Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen SJ, Székely T. (2007). Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Anim Behav.* 2007;73:987-997.doi:10.1016/j.anbehav.2006.08.012

Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A., Azpilicueta-Amorín, M., González-Soriano, E., e Szekely, T. (2008). Sexual selection, sexual size dimorphism and Rensch's rule in Odonata. *Journal of evolutionary biology*, 21(5), 1259-1273.

Sokolovska, N., Rowe, L., e Johansson, F. (2000). Fitness and body size in mature odonates. *Ecological Entomology*, 25(2), 239-248.

Smith, R. L. (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Elsevier, pp. 687.

Stoks, R., Córdoba-Aguilar, A. (2012). Evolutionary ecology of Odonata: a complex life cycle perspective. *Annual review of entomology*, 57, 249-265.

Suhonen, J., Rantala, M. J., e Honkavaara, J. (2008). Territoriality in odonates. Em: Dragonflies and damselflies: model organisms for ecological and evolutionary research. Oxford University Press, *Oxford*, 203-218.

Számadó, S. (2011). The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour*, 81(1), 3-10.

Taborsky, M., Oliveira, R. F., e Brockmann, H. J. (2008). The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions. Em: Alternative reproductive tactics: an integrative approach, 1-21.

Taborsky, M., Brockmann, H. J. (2010). Alternative reproductive tactics and life history phenotypes. In *Animal behaviour: evolution and mechanisms* (pp. 537-586). Springer Berlin Heidelberg.

Waage, J. K. (1979). Adaptive significance of postcopulatory guarding of mates and nonmates by male *Calopteryx maculata* (Odonata). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 6(2), 147-154.

Waltz, E. C. (1982). Alternative mating tactics and the law of diminishing returns: the satellite threshold model. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 10(2), 75-83.

2. Capítulo I - Pintura facial de guerra: sinais visuais influenciam o resultado de disputas territoriais na libélula-tigre *Tigriagrion aurantinigrum* Calvert 1909 (Zygoptera, Coenagrionidae)

2.1 Resumo

Machos de diversos animais exibem padrões de coloração conspícuos que mediam a competição por acasalamentos. Machos de libélulas da família Coenagrionidae geralmente exibem vistosos padrões sexualmente dimórficos de coloração. No entanto, não existem evidências suficientes do papel desses traços corporais como sinais de comunicação intraespecífica. Portanto, no presente estudo, foi investigado se a pigmentação facial é selecionada via competição intrasexual em machos da libélula-tigre *Tigriagrion aurantinigrum* (Zygoptera: Coenagrionidae). Foram observados 35 machos, que tiveram seu status territorial e resultado de lutas anotados. Medidas foram tomadas da cabeça e manchas pós-oculares dos machos utilizando fotografias e um script em linguagem MatLab. A característica química do pigmento foi também analisada. Machos vencedores apresentaram maior tamanho e massa corporal, e pigmentação laranja pós-ocular quando comparados a machos perdedores. A pigmentação pós-ocular mostrou uma correlação positiva com o tamanho e massa corporal dos machos. Portanto, os resultados sugerem que a pigmentação laranja da região pós-ocular da cabeça é derivada de pteridina e pode ser um sinal honesto da qualidade física dos machos, predizendo resultado de lutas e a competição por territórios na libélula-tigre.

Palavras-chave: sinais honestos, competição, comportamento territorial, pteridina

2.2 Abstract

Males of many animals exhibit conspicuous traits that mediate competition for mates. Male coenagrionid damselflies usually exhibit bright sexually dimorphic coloration patterns. However, there is a lack of evidence on the role of these visual traits as signals in intraspecific communication. Therefore, we addressed whether face pigmentation is selected via intrasexual competition in males of the tiger damselfly *Tigriagrion aurantinigrum* (Zygoptera: Coenagrionidae). We observed 35 males, noting their territorial status and contest outcome. Head and orange markings in male heads were measured using photographs and a script for MatLab language. Winners exhibited larger body size, body weight and head orange pigmentation when compared to losers. Post-ocular pigmentation exhibited a positive correlation with male body size and body weight. Male coloration, body size and weight were positively correlated with territory quality. Our results suggest that orange pigmentation on the post-ocular area of the head is pteridine based and may be an honest signal of male quality, predicting contest outcome and the competition for territories in tiger damselflies.

Keywords: honest signals, competition, territorial, behavior, pteridine

2.3 Introdução

Dentre os princípios da Seleção Sexual, proposta por Darwin (1871), os caracteres sexuais secundários são tidos como traços diferenciais que indivíduos apresentam e que estão relacionados com o seu sucesso reprodutivo. Considerando estes traços, os sinais visuais são importantes indicadores de qualidade utilizados na comunicação animal, que transmitem uma informação por meio de lutas e complexos repertórios de corte (Andersson, 1994; Osorio e Vorobyev, 2008; Guillermo-Ferreira *et al.* 2015).

Machos de diversos animais possuem sinais visuais conspícuos que são selecionados através de interações intra e intersexuais, que mediam a competição por fêmeas. Por sua vez, a coloração das asas de libélulas (Guillermo-Ferreira e Del-Claro 2011a; Guillermo-Ferreira *et al.* 2015b; Xu e Fincke 2015), faixas corporais em peixes ciclídeos (Rodrigues *et al.* 2012) e a pigmentação facial em vespas (De Souza *et al.* 2014; Petrocelli *et al.* 2015) são tidas como preditoras do sucesso reprodutivo nestes animais (Andersson, 1994). Nas vespas, por exemplo, o tamanho das máculas na cabeça determina o ranking de dominância dentro das colônias e prediz o resultado de interações agressivas (Referência). Tais padrões de coloração são considerados indicadores da qualidade dos indivíduos e, portanto, são capazes de intermediar a comunicação intra e intersexual (Andersson, 1994).

Diversas substâncias são conhecidas por conferir coloração da pele ou tegumento em animais como a melanina, carotenóides e pteridinas são considerados indicadores honestos da qualidade dos machos em muitas espécies (Hooper *et al.* 1999; Cordoba-Aguilar, 2002; McGraw *et al.* 2005; Hamilton *et al.* 2013). A honestidade dos sinais é definida por diversos autores como

uma correlação entre um sinal observável e uma qualidade não observável (Szamadó, 2011). Em outras palavras, um sinal visual pode ser um indicador indireto da condição física do indivíduo.

Em Odonata, a pigmentação tem o papel de mediar a resolução de conflitos e a escolha das fêmeas (Córdoba-Aguilar, 2008). Por exemplo, em *Hetaerina americana*, a pigmentação das asas é correlacionada com as reservas energéticas, imunocompetência e massa muscular (Contreras-Garduño *et al.* 2006), que influencia no resultado das interações agonísticas. Em *Calopteryx*, machos com asas mais pigmentadas têm maior sucesso na aquisição de cópulas (Siva-Jothy 1999), e a coloração corporal metálica do corpo pode prever o status territorial do macho (Fitzstephens e Getty 2000). A pigmentação das asas também afeta o reconhecimento intersexual e a resolução de disputas territoriais em *Mnesarete pudica* (Guillermo-Ferreira *et al.* 2012, 2015a).

Em Coenagrionidae, machos frequentemente apresentam coloração corporal dimórfica e conspícua. No entanto, não há evidência do papel de tais padrões de coloração como sinais visuais mediadores de interações entre machos. Encontros agonísticos entre machos de Zygoptera geralmente consistem em *displays* face-a-face (Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012; Robertson, 1985; Guillermo-Ferreira *et al.* 2014). Estes animais geralmente possuem manchas conspícuas na região pós-ocular da cabeça, que contrastam com uma coloração de cor preta. Considerando que evidências recentes sugerem que a pigmentação facial é utilizada como sinal intrasexual de qualidade (De Souza *et al.* 2014; Petrocelli *et al.* 2015), deve-se também considerar a hipótese de que a coloração facial pode ser utilizada em *displays* face-a-face de coenagrionídeos para a resolução de conflitos. Portanto, no presente capítulo, foi testada a

hipótese de que a pigmentação facial em Coenagrionidae pode ser utilizada na comunicação entre os indivíduos.

Deste modo, foi investigado se a coloração facial é selecionada via competição intra-sexual em machos da libélula-tigre *Tigriagrion aurantinigrum* (Odonata: Coenagrionidae). Machos desta espécie possuem manchas pretas e laranja na região pós-ocular, formando um padrão semelhante ao de tigres, único na família Coenagrionidae, que dá nome à espécie. Dessa forma, foi avaliado se esta coloração facial é capaz de predizer o resultado de lutas territoriais e a qualidade dos territórios defendidos pelos machos. É esperado que machos detentores de maiores manchas laranja vençam mais combates e defendam os melhores territórios. Uma vez que a massa corporal e o tamanho são frequentemente relacionados com a condição dos indivíduos (Contreras-Garduño *et al.* 2006), também é esperado que a pigmentação facial seja um sinal honesto da qualidade do indivíduo e, portanto, dependente da condição física, consequentemente correlacionada positivamente com tamanho e massa corporal. Finalmente, foi investigada se a característica química do pigmento é derivada de pteridina ou carotenóides, uma vez que essa caracterização pode indicar os custos de se obter ou sintetizar o sinal visual, tornando-o honesto. Pigmentos à base de carotenóides são comuns em penas de aves, em escamas peixes, barbelas de lagartos e na carapaça de alguns crustáceos (McGraw *et al.* 2005; Hamilton *et al.* 2013). Os carotenóides não podem ser sintetizados pelo organismo dos animais, portanto precisam ser obtidos através da dieta (McGraw *et al.* 2005). Isto indica que, para a manutenção e utilização deste pigmento como sinal visual, é necessário investimento energético na obtenção deste recurso (McGraw *et al.* 2005). Por sua vez, as pteridinas são compostos que podem ser sintetizados pelo organismo dos animais, no entanto os custos para se obter a matéria-prima para a sua síntese são considerados igualmente difíceis (Griffith *et al.* 2006).

2.4 Material e métodos

Local de estudo

O trabalho de campo foi conduzido em uma área de Vereda, ambiente endêmicos de água doce que sustenta uma grande biodiversidade, com ocorrência em grande parte da Savana Neotropical (Fonseca, 2005; Araújo *et al.* 2013). O local de estudo é situado dentro da Reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, sudeste do Brasil, a qual compreende uma área total de 640 hectares de área conservada de Cerrado (18°57' S; 48° 12' W).

Observações comportamentais

Machos foram coletados com uma rede entomológica, marcados com números individuais na asa posterior direita com uma caneta permanente, medidos com um paquímetro digital (0.01 mm) e liberados. Observações focais de 15 minutos foram feitas em 35 machos territoriais marcados. A territorialidade dos machos foi determinada quando os machos retornavam aos seus poleiros após uma luta ou evento de patrulha e permaneciam defendendo um território (em geral de 1m² de área) durante todo o tempo de observação (Corbet 1999). Durante cada observação, focal foram anotados: (i) o número de lutas vencidas; (ii) a duração das lutas e (iii) a duração dos voos de patrulha. O número de lutas vencidas pelos machos representa a sua capacidade de defender um recurso, neste caso o território, o qual é disputado entre os machos de uma população. A duração das lutas sinaliza a capacidade física de se manter em um combate para se manter no território. A duração dos voos de patrulha indica o quanto

machos dispõem de energia suficiente para percorrer seu território à procura de fêmeas. Foram considerados voos de patrulha aqueles onde os machos fizeram voos curtos por seu território, retornando ao poleiro inicial sem nenhuma interação com conspecíficos.

Machos que perderam todos os combates foram considerados perdedores e machos que venceram pelo menos um combate foram considerados vencedores (referência). Após uma luta entre dois indivíduos, os machos que retornaram aos territórios foram considerados vencedores, e os machos que voaram para longe do território, perdedores. A duração das lutas e dos eventos de patrulha foram adotados como medida das atividades despendidas pelos machos com atividades territoriais, os quais são indicadores indiretos da qualidade dos territórios (Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012a). Estas medidas foram realizadas utilizando um cronômetro Casio W-735H. Ao final de todas as observações, os machos foram então coletados e levados ao laboratório para análises posteriores. No laboratório, os indivíduos foram pesados em uma balança de precisão (0,0001g), e tiveram as cabeças removidas para quantificar a pigmentação pós-ocular (veja abaixo).

Traços visuais dos machos

Para avaliar se a pigmentação prediz o resultado de interações agonísticas entre os machos e a qualidade do território, foi utilizado um método em linguagem de programação Mat Lab, onde a quantidade de coloração foi avaliada. Primeiramente as regiões pós-oculares de 35 machos foram fotografadas com uma câmera digital (Canon® 1200D, lentes EF 100mm Macro) (Figura 1 a, b). Então foi calculada, em pixels, a área total da região pós-ocular excluindo-se os olhos e a região abaixo dos ocelos (Figura 1 c, d). As áreas cobertas por pigmentação preta foram

marcadas manualmente no programa ImageJ (Rasband, 2008) para padronizar essas regiões ao mais escuro nível de intensidade (Figura 1 c, d). Em seguida, as áreas marcadas em preto foram subtraídas da área pós-ocular total, para obter a área coberta pela pigmentação laranja (Figura 1 e, f), considerando a quantidade de pixels. Foi também avaliada a relação entre o tamanho/massa corporal e a pigmentação, uma vez que essas relações podem indicar dependência de condição e seleção atuando na coloração dos machos (Bonduriansky, 2007).

Figura 1. Cabeças de dois machos de *T. aurantinigrum* (a, b) com diferenças visíveis na quantidade de pigmentação laranja na região pós-ocular (c, d). Regiões cobertas por pigmentação preta da região pós-ocular que foram subtraídas para a obtenção da área coberta por pigmentação laranja (e, f).

Identificação do pigmento laranja

Para identificar as características químicas presentes nos pigmentos da região pós-ocular, foram realizados dois ensaios baseados nos métodos descritos por McGraw *et al.* (2005), Kikuchi e Pfennig (2012) e Hamilton *et al.* (2013). Para ambos ensaios, foram usadas amostras de 10mg, contendo 12 cabeças de machos de *T. aurantinigrum*. Para cada ensaio, foi preparado um tubo-controle contendo os compostos químicos porém sem a adição das amostras. Este controle é necessário para evidenciar a separação das fases, mesmo sem a presença das amostras.

Como primeiro ensaio, foi avaliado se o pigmento presente é derivado de carotenóides. Foram preparados dois tubos: no primeiro, as amostras de *T. aurantinigrum*; no segundo o controle contendo apenas os compostos químicos (Figura 2). Nos tubo de ensaio foram adicionados 1ml de piridina acidificada (com ácido clorídrico, HCl). Em seguida os tubos foram colocados em banho Maria a 95° C para liberar qualquer possível carotenóide presente no tecido (McGraw *et al.*, 2005). Após quatro horas, foram adicionados 2ml de água destilada e 1ml de acetato de etila (C₄H₈O₂), um solvente orgânico. Após cinco minutos na centrífuga, duas fases são observadas na solução, de acordo com as suas características de polarização. A presença de carotenóides é indicada se a fase apolar (superior) apresentar coloração (McGraw *et al.*, 2005).

Figura 2 - Amostras contendo as cabeças de *T. aurantinigrum* (a); e o controle negativo (b) antes da adição do solvente orgânico.

A presença de pteridinas foi avaliada adicionando-se 1ml de hidróxido de amônia (1N NH_4OH) na amostra de 10mg, para dissolver quaisquer possíveis pigmentos à base de pteridina, e então homogeneizada a solução por um minuto. Em seguida, foi adicionado 0.5ml de acetato de etila e a solução foi centrifugada por um minuto. Este procedimento permite separar possíveis pigmentos e partículas orgânicas da fase aquosa. Ao final do procedimento, se a fase polar aquosa (inferior) estiver colorida, é atribuída a presença de pteridinas (Kikuchi e Pfennig, 2012).

Análise estatística

A relação entre os traços corporais dos machos (i.e. tamanho corporal, massa corporal e pigmentação laranja) e o resultado das lutas foi analisado com um Modelo Linear Generalizado Binomial (GLM), definindo os traços corporais dos machos como variáveis preditoras e a identidade vencedor/perdedor como variável dependente. Para avaliar a relação entre a pigmentação pós-ocular, a massa corporal e tamanho, foram utilizadas regressões lineares simples. A relação entre o tempo gasto em eventos de patrulha e lutas com a pigmentação foi analisada com regressões múltiplas. Os dados foram normalizados, com variáveis transformadas em log. A análise dos dados foi feita utilizando o software Statistica®10.1, e a programação realizada em linguagem MatLab.

2.5 Resultados

Comportamento geral

Foram observadas 118 interações agonísticas entre os 35 machos de *T. aurantinigrum* observados neste estudo. Os comportamentos agonísticos ocorreram assim que um macho invadia o território de outro. Os machos se enfrentam encarando-se, em um comportamento conhecido como *face-off*, e os vencedores em seguida afastam o invasor para fora de seu território (Figura 3a). As lutas tiveram duração média de $2,7 \pm 1,42$ segundos.

Relação entre o tamanho corporal, massa e a pigmentação pós-ocular

Machos vencedores exibiram maiores manchas de pigmentação laranja quando comparados a machos perdedores (Figura 3b). A pigmentação pós-ocular exibiu uma correlação positiva com o tamanho corporal (Regressão simples, $r^2 = 0,65$; $t = 5,03$; $p = 0,00001$; $N = 35$) e a massa (Regressão simples, $r^2 = 0,59$; $t = 4,2$; $p = 0,0001$; $N = 35$) (Figura 3c, d).

Figura 3. Representação do movimento de *face-off* realizado pelos machos no momento das disputas territoriais (a); Regressão simples mostrando a diferença na quantidade de pigmentação pós-ocular em machos vencedores e perdedores (b); Regressão simples mostrando a correlação positiva entre a pigmentação pós-ocular e o tamanho (c) e massa corporal (d).

Pigmentação pós-ocular como preditor da qualidade territorial e resultado de lutas

A pigmentação laranja da região pós-ocular prediz o resultado das lutas (Tabela 1). A pigmentação dos machos também prediz o tempo gasto em eventos de patrulha do território

(Regressão múltipla, $\beta = 0,462$; $t = 2,952$; $p = 0,005$), mas não o tempo gasto em eventos de luta (Regressão múltipla, $\beta = 0,152$; $t = 0,974$; $p = 0,337$).

Tabela 1. Resultados do Modelo Linear Generalizado Binomial (GLM) mostrando a relação entre os traços corporais dos machos (tamanho, massa corporal e pigmentação) com o resultado das lutas. Resultados significativos em negrito.

	Tamanho			Massa			Pigmentação		
	Wald	CL (%)	<i>P</i>	Wald	CL (%)	<i>P</i>	Wald	CL (%)	<i>P</i>
Resultado das lutas	1,22	-269 - 74	0,26	2,35	-7 - 57	0,12	4,07	0,4 - 29	0,04

Caracterização do pigmento

O ensaio para avaliar se a pigmentação era derivada de carotenóides foi eficiente na extração dos pigmentos dos machos. No entanto, após a adição do solvente orgânico e a centrifugação, a porção pigmentada permaneceu na porção polar da solução (i.e. porção inferior, contendo piridina acidificada), enquanto a fase apolar da solução (i.e. porção superior, contendo $C_4H_8O_2$) permaneceu incolor, portanto refutando a presença de pigmentos à base de carotenóides (Figura 4 A).

O ensaio para avaliar a presença de pteridinas foi também eficiente na extração dos pigmentos. Mesmo antes da centrifugação, a solução 1N NH_4OH começou a extrair os

pigmentos do tecido. Após a adição do solvente orgânico e a centrifugação, a fase apolar (contendo $C_4H_8O_2$) permaneceu incolor, enquanto a fase polar (contendo 1N NH_4OH) ficou colorida com o pigmento laranja presente no tecido, portanto indicando a presença de pteridinas (Figura 4 B).

Figura 4 - A: Amostras contendo o controle negativo (1); e as cabeças de *T. aurantigrum* (2); após da adição do solvente orgânico, mostrando que a fase superior permaneceu incolor. B: Tubo de ensaio contendo amostras da região pós-ocular de *T. aurantigrum* (1) e outro tubo sem amostras como controle (2), mostrando claramente as fases apolar superior e polar inferior das soluções. A porção polar da solução se coloriu com o pigmento presente no tecido dos machos, indicando a presença de pteridinas

2.6 Discussão

Os resultados aqui obtidos indicam que a pigmentação laranja na região pós-ocular dos machos é composta por pteridina e pode prever o resultado de lutas e a competição por territórios na libélula tigre. Tamanho corporal e massa dos machos também são bons preditores da habilidade competitiva em odonatos (Fincke, 1982; Grether, 1996; Serrano-Meneses *et al.* 2007; Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012 a, b) e também determinaram o resultado das lutas na espécie deste estudo. Ainda, machos com maiores quantidades de pigmento laranja realizaram mais voos de patrulha. Além disso, em *T. aurantinigrum* a pigmentação pós-ocular foi também relacionada com tamanho corporal e massa, indicando que machos maiores também exibem as maiores manchas pós-oculares. Tamanho e massa corporal frequentemente se correlacionam com a qualidade dos machos e a condição física em odonatos (Tsubaki e Ono 1987, Plaistow e Siva Jothy, 1996, Sokolovska *et al.* 2000), predizendo a habilidade competitiva e o sucesso reprodutivo de machos (Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012 b). Os resultados obtidos neste capítulo sugerem que as manchas pós-oculares em *T. aurantinigrum* podem ser sinais da habilidade de luta dos machos, dependentes da sua condição física (e.g. Hamilton *et al.* 2013). Portanto, de acordo com a literatura, esta é a primeira evidência de sinais visuais pós-oculares indicando a qualidade dos machos em Odonata.

Em muitos táxons animais, os padrões de coloração podem ser considerados sinais honestos da qualidade dos machos, indicando habilidade de luta e dominância (Zahavi 1975, 1977; Berglund, 1996). Na literatura, o papel da pigmentação baseada em pteridinas e carotenóides como indicadores de qualidade é amplamente estudada (MacDougall e Montgomerie, 2003; Massaro *et al.* 2003; McGraw *et al.* 2005; Hamilton *et al.* 2013). Uma vez

que carotenóides não podem ser sintetizados pelo organismo e devem ser obtidos através da dieta, a variação na quantidade de pigmento pode refletir a condição nutricional do indivíduo (McGraw *et al.* 2005). Por exemplo, a coloração vermelho-laranja à base de carotenóides das barbelas do lagarto Australiano *Chlamydosaurus kingii* pode prever a qualidade do macho, resultado das lutas e a escolha das fêmeas (Hamilton *et al.* 2013).

Pteridinas e melanina recentemente mostraram ter um papel similar ao dos carotenóides na comunicação animal. A habilidade de obter a matéria-prima necessária para sintetizar pteridinas e melanina se revelou igualmente ou mais difícil do que propriamente obter o pigmento pronto na natureza. Portanto, pigmentos à base de pteridina, como encontrados em *T. aurantinigrum* podem ser considerados bons indicadores da qualidade dos machos (Griffith *et al.* 2006). Por exemplo, manchas amarelas derivadas de pteridina presentes em vespas-do-papel influenciam a escolha das fêmeas e podem prever a qualidade dos machos (De Souza *et al.* 2014; Izzo e Tibbetts, 2015).

O tamanho de manchas pretas derivadas de melanina em machos de vespa-do-papel *Polistes simillimus* e *P. gallicus* (De Souza *et al.* 2014; Petrocelli *et al.* 2015) podem influenciar no resultado de combates. No peixe barrigudinho (i.e. *guppies*), conspícuas manchas laranjas são sinais multicomponentes derivados tanto de pigmentos à base de carotenóides quanto de pteridinas, e podem influenciar o sucesso reprodutivo dos machos (Grether *et al.* 2001). Portanto, os resultados aqui obtidos adicionam mais evidências à literatura, mostrando que a pigmentação corporal conspícua à base de pteridina pode indicar a qualidade individual e também sua condição fisiológica, conseqüentemente, influenciando no sucesso reprodutivo dos animais.

Em Odonata, pigmentos à base de melanina nas asas são conhecidos por serem sinais honestos da qualidade dos machos e do desenvolvimento larval. Por exemplo, machos de *Mnais costalis* tratados com uma dieta rica em proteína durante a fase de desenvolvimento larval, exibiram asas mais escuras quando comparados a machos submetidos a uma dieta pobre em nutrientes (Hooper *et al.* 1999). Em machos de *Hetaerina*, o tamanho das manchas vermelhas nas asas é um indicador das reservas de gordura, imunocompetência e massa muscular (Contreras-Garduño *et al.* 2006), indicadores diretos da qualidade do indivíduo e preditores da competição entre os machos (Grether 1996, Guillermo-Ferreira e Del-Claro 2011a). Ainda, em *Calopteryx* (Rantala *et al.* 2000) e *Mnesarete* (Guillermo-Ferreira e Bispo 2012, Guillermo-Ferreira *et al.* 2015a), este traço tem dupla função na resolução de conflitos e escolha das fêmeas.

Em Coenagrionidae, os machos se encaram durante as lutas (i.e. *face-off*) sem agressão física (Robertson 1985; Guillermo-Ferreira e Del-Claro 2012 b; Guillermo-Ferreira *et al.* 2014), o que é uma estratégia de resolução de conflitos comum em vários táxons animais. Neste caso, machos geralmente adotam estratégias de lutas sem contato e usam os sinais visuais para a resolução desses conflitos (Kemp, 2002; Briffa, 2015; Guillermo-Ferreira *et al.* 2015 a). Portanto, tais combates não agressivos corroboram a hipótese inicial de que os traços visuais presentes na região pós-ocular funcionam como sinais de status, para evitar interações caras do ponto de vista energético. Uma vez que nenhuma luta observada evoluiu para o combate físico, machos da libélula-tigre provavelmente avaliam os sinais visuais dos rivais, como já observado em outros zigópteros (Guillermo-Ferreira *et al.* 2015a). Neste contexto, os conflitos podem favorecer machos maiores e mais fortes, que consequentemente defendem melhores territórios, o que pode resultar em um ganho no sucesso reprodutivo. Os resultados obtidos aqui corroboram esta hipótese pois machos maiores com maiores manchas pós-oculares defenderam os melhores

territórios e patrulharam ativamente por eles. No entanto, ainda não é sabido se os traços visuais podem influenciar diretamente o sucesso reprodutivo nesta espécie.

Outra interessante consideração são os custos e desvantagens (i.e. *handicaps*) que são geralmente impostos a indivíduos que alocam energia nos sinais visuais, em termos de longevidade reduzida, aumento no risco de predação, susceptibilidade a parasitas e fecundidade reduzida (Zahavi, 1975; 1977; Grafen, 1990). No caso da libélula-tigre, machos mais ornamentados podem sofrer com o aumento no risco de predação devido ao aumento de visibilidade por parte dos predadores (Fowler-Finn e Hebets 2011). Machos mais ornamentados geralmente investem mais recursos e energia na produção de pigmentos, o que pode resultar na redução da longevidade e fecundidade (Kemp e Grether 2015).

Como mostrado pelos resultados, a quantidade de área contendo pigmentação laranja nos machos de *T. aurantinigrum* varia entre os indivíduos e machos com manchas maiores são territoriais, vencem disputas contra coespecíficos e, portanto, podem ter maior sucesso reprodutivo. No entanto, são mantidos na população machos com pouca e muita pigmentação laranja. O pigmento que contrasta com o padrão laranja de coloração em *T. aurantinigrum* é preto, derivado de melanina. Machos com maiores manchas laranja derivadas de pteridina, tem menores quantidades de melanina, ao passo que o contrário acontece com machos que ostentam menores manchas laranja. A melanina é um pigmento importante no sistema imunológico em insetos, que auxilia no encapsulamento de corpos estranhos (Schmidt-Hempel, 2005) e a capacidade de síntese desse pigmento está relacionada com as reservas de gordura presentes no organismo (Arrese e Soulages, 2010). Portanto, machos com maiores quantidades de melanina podem ser beneficiados com um sistema imune mais eficiente, o que pode influenciar em sua

longevidade e fecundidade (Kemp e Grether 2015). Em conclusão, este estudo adiciona evidência sobre como a variação nos sinais visuais pode ter um importante papel na comunicação animal e na resolução de conflitos. Muita atenção tem sido dada a diferentes modos de comunicação em insetos (Guillermo-Ferreira *et al.* 2014, 2015a, 2015b; De Souza *et al.* 2014). Portanto, no presente capítulo, destaca-se a importância do estudo da variação na comunicação visual em diferentes táxons. Por exemplo, em Odonata existem diversos sinais repletos de cor que vão desde a pigmentação por melanina (Grether, 1996; Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2011a; Stavenga *et al.* 2012; Guillermo-Ferreira *et al.* 2015a), reflexão ultravioleta (Guillermo-Ferreira *et al.* 2014; Xu e Fincke 2015), emissão de fluorescência (Guillermo-Ferreira *et al.* 2014), iridescência derivada de interferência multi-camadas (Vukusic *et al.* 2004; Schultz e Fincke 2009), até a ultraestrutura hierárquica da cera cuticular (Guillermo-Ferreira *et al.* 2015b), que têm um papel na comunicação intra e intersexual.

Finalmente, o presente estudo adiciona importante evidência no papel da comunicação visual em Odonatos, fornecendo a primeira evidência de que a coloração pós-ocular de machos influencia no resultado de lutas na família Coenagrionidae. Estes resultados indicam que machos de *T. aurantinigrum* possuem sinais honestos da condição física dos indivíduos, uma vez que o sinal visual se correlaciona com traços corporais como tamanho e massa corporal. Além disso, essa honestidade é constantemente testada em lutas territoriais, evitando que o sinal seja desonesto (Zahavi 1975, 1977; Berglund, 1996). Estudos futuros podem elucidar sobre o papel da dieta dos imaturos na alocação de recursos para os sinais visuais e ainda, como machos com menores manchas conseguem se manter na população. Os padrões de coloração têm sido selecionados e explorados de diversas formas em odonatos, o que sugere sua importância como modelos de estudo na comunicação visual animal.

2.7 Referências bibliográficas

Andersson MB. (1994). Sexual Selection. Princeton University Press.

Araújo GM, Amaral AF, Bruna EM, e Vasconcelos HM. (2013). Fire drives the reproductive responses of herbaceous plants in a Neotropical swamp. *Plant Ecology*, 214:1479-1484.doi:10.1007/s11258-013-0268-9

Arrese, E. L., e Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207.

Berglund, A., Bisazza, A., e Pilastro, A. (1996). Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 385-399.

Bonduriansky, R. (2007). The Evolution of Condition-Dependent Sexual Dimorphism. *The American Naturalist*, 169(1): 9-19.

Briffa, M (2015). Agonistic Signals: Integrating Analysis of Functions and Mechanisms. *Animal Signaling and Function: An Integrative Approach*, 141-173.

Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J, e Córdoba-Aguilar A. (2006). Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology*, 24:165-173.doi:10.1007/s10164-005-0177-z

Córdoba-Aguilar A. (2002). Wing pigmentation in territorial male damselflies, *Calopteryx haemorrhoidalis*: a possible relation to sexual selection. *Animal Behaviour*, 63:759-766.doi:10.1006/anbe.2001.1974

De Souza A, Mourão CA, Do Nascimento FS, Lino-Neto J. Sexy faces in a male paper wasp. *PLoS One*. 2014 ;9: 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0098172

Fincke OM 1982. Lifetime mating success in a natural population of the damselfly, *Enallagma hageni* (walsh) (odonata:coenagrionidae). *behavioural ecology and sociobiology*, 10: 293-302

Fitzstephens, D. M., e Getty, T. (2000). Colour, fat and social status in male damselflies, *Calopteryx maculata*. *Animal Behaviour*, 60(6), 851-855.

Fonseca CP. Caracterização dos ecossistemas aquáticos do Cerrado. In: Scariot A, Sousa-Silva JC, Felfili JM, editors. *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente; 2005. pp. 25-44.

Grether G. 1996. Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *evolution*, 50 1939-1948

Guillermo-Ferreira R, Del-Claro K. Resource defense polygyny by *Hetaerina rosea* Selys (Odonata: Calopterygidae): influence of age and wing pigmentation. *Neotrop Entomol*. 2011a; 40: 78–84. doi:10.1590/S1519-566X2011000100011

Guillermo-Ferreira R, Del Claro K. Reproductive behavior of *Acanthagrion truncatum* Selys, 1876 (Odonata: Coenagrionidae). Int J Odonatol. 2012a;15: 299–304. doi:10.1080/13887890.2012.740596

Guillermo-Ferreira R, Del-Claro K. (2012a). Territoriality and male-biased sexual size dimorphism in *Argia reclusa* (Odonata: Zygoptera). Acta Ethol. 2012b; 15: 101–105. doi:10.1007/s10211-011-0114-9

Guillermo-Ferreira, R., e Bispo, P. C. (2012b). Male and female interactions during courtship of the Neotropical damselfly *Mnesarete pudica* (Odonata: Calopterygidae). *acta ethologica*, 15(2), 173-178.

Guillermo-Ferreira R, Neiss UG, Hamada N, Bispo PC. (2014). Behavior of the Amazonian damselfly *Chalcopteryx scintillans* McLachlan (Zygoptera: Polythoridae) and comments on its morphological distinction from *C. rutilans* (Rambur). Int J Odonatologica, 17: 251–258. doi:10.1080/13887890.2014.983189

Guillermo-Ferreira R, Gorb SN, Appel E, Kovalev A, Bispo PC. (2015a). Variable assessment of wing colouration in aerial contests of the red-winged damselfly *Mnesarete pudica* (Zygoptera, Calopterygidae). Sci Nat. 2015a; 102. doi:10.1007/s00114-015-1261-z

Guillermo-Ferreira, R., Bispo, P. C., Appel, E., Kovalev, A., e Gorb, S. N. (2015b). Mechanism of the wing colouration in the dragonfly *Zenithoptera lanei* (Odonata: Libellulidae) and its role in intraspecific communication. *Journal of insect physiology*, 81, 129-136.

Grafen, A. (1990). Biological signals as handicaps. Journal of theoretical biology, 144(4), 517-546.

Grether GF. (1996). Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *hetaerina americana*. *Evolution*, 50: 1939-1948.

Grether, G. F., Hudon, J., e Endler, J. A. (2001). Carotenoid scarcity, synthetic pteridine pigments and the evolution of sexual coloration in guppies (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1473), 1245-1253.

Griffith, S. C., Parker, T. H., e Olson, V. A. (2006). Melanin-versus carotenoid-based sexual signals: is the difference really so black and red?. *Animal Behaviour*, 71(4), 749-763.

Hamilton DG, Whiting MJ, Pryke SR. Fiery frills: carotenoid-based coloration predicts contest success in frillneck lizards. *Behav Ecol*. 2013;24:1138-1149.doi:10.1093/beheco/art041

Hooper, R. E., Tsubaki, Y., and Siva-Jothy, T. 1999. Expression of a costly, plastic secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiological Entomology* 24, 364–369.

Izzo, A., Tibbetts, E. A. (2015). Heightened Condition Dependence of a Sexually Selected Signal in Male *Polistes dominulus* Paper Wasps. *Ethology*, 121(6), 586-592.

Kemp, D. J. (2002). Sexual selection constrained by life history in a butterfly. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1498), 1341-1345.

Kemp, D. J., e Grether, G. F. (2015). Integrating Functional and Evolutionary Approaches to the Study of Color-Based Animal Signals. *Animal Signaling and Function: An Integrative Approach*, 111-140.

Kikuchi, D. W., e Pfennig, D. W. (2012). A Batesian mimic and its model share color production mechanisms. *Current Zoology*, 58(4).

McGraw K.J., Hudon J., Hill G.E., Parker R.S. (2005). A simple and inexpensive chemical test for behavioral ecologists to determine the presence of carotenoid pigments in animal tissues. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57:391-397.

MacDougall, A. K., e Montgomerie, R. (2003). Assortative mating by carotenoid-based plumage colour: a quality indicator in American goldfinches, *Carduelis tristis*. *Naturwissenschaften*, 90(10), 464-467.

Massaro, M., Davis, L. S., e Darby, J. T. (2003). Carotenoid-derived ornaments reflect parental quality in male and female yellow-eyed penguins (*Megadyptes antipodes*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(2), 169-175.

Petrocelli I, Ricciardi G, Rodrigues de Souza A, Ermanni A, Ninu A, Turillazzi S. Visual Signals of Individual Quality in a European Solitary Founding Paper Wasp. *Ethology*. 2015;121:300–307. doi:10.1111/eth.12339

Plaistow S, Silva-Jothy MT. Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proc R Soc Lond B*. 1996; 263:1233-1239. doi:10.1098/rspb.1996.0181

Rantala, M. J., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K., e Suhonen, J. (2000). Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx*

splendens L. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1460), 2453-2457.

Rasband, W. S. (2008). ImageJ. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

Robertson HM. Female dimorphism and mating behaviour in a damselfly, *Ischnura ramburii*: females mimicking males. *Anim Behav.* 1985;33: 805–809. doi:10.1016/S0003-3472(85)80013-0

Rodrigues RR, Zuanon J, Del-Claro K, Carvalho LN. Reproductive behavior of the Amazonian dwarf cichlid *Apistogramma hippolytae* Kullander, 1982: Offsetting costs and benefits. *Acta Ethol.* 2012;15: 47–53. doi:10.1007/s10211-011-0107-8

Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 50, 529-551.

Schultz, T. D., e Fincke, O. M. (2009). Structural colours create a flashing cue for sexual recognition and male quality in a Neotropical giant damselfly. *Functional ecology*, 23(4), 724-732.

Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen SJ, Székely T. Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Anim Behav.* 2007;73:987-997. doi:10.1016/j.anbehav.2006.08.012

Siva-Jothy, M. T. (1999). Male wing pigmentation may affect reproductive success via female choice in a calopterygid damselfly (Zygoptera). *Behaviour*, 136(10), 1365-1377.

Sokolovska, N., Rowe, L., e Johansson, F. (2000). Fitness and body size in mature odonates. *Ecological Entomology*, 25(2), 239-248.

Stavenga, D. G., Leertouwer, H. L., Hariyama, T., De Raedt, H. A., e Wilts, B. D. (2012). Sexual dichromatism of the damselfly *Calopteryx japonica* caused by a melanin-chitin multilayer in the male wing veins.

Számádó, S. (2011). The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour*, 81(1), 3-10.

Tsubaki, Y., e Ono, T. (1987). Effects of age and body size on the male territorial system of the dragonfly, *Nannophya pygmaea* Rambur (Odonata: Libellulidae). *Animal Behaviour*, 35(2), 518-525.

Vukusic, P., Wootton, R. J., e Sambles, J. R. (2004). Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus)(Zygoptera: Calopterygidae). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1539), 595-601.

Xu M, e Fincke OM. (2014). Ultraviolet wing signal affects territorial contest outcome in a sexually dimorphic damselfly. *Anim Behav.* Elsevier Ltd; 2015;101: 67–74. doi:10.1016/j.anbehav.2014.12.018

Zahavi, A. (1975). Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*, 53(1), 205-214.

Zahavi, A. (1977). The cost of honesty: further remarks on the handicap principle. *Journal of theoretical Biology*, 67(3), 603-605.

3. Capítulo II - Táticas alternativas de acasalamento em *Epipleoneura williamsoni*, Santos 1957 (Coenagrionidae: Protoneurinae)

3.1 Resumo

Táticas alternativas de acasalamento (*alternative mating tactics*, AMT) são apresentadas por diversos animais para responder a um dado fator fisiológico ou ambiental que afeta o seu sucesso reprodutivo. Em outras palavras, machos podem exibir diferentes táticas para conseguir se acasalar. É apresentado aqui o caso da libélula não-territorial *Epipleoneura williamsoni* onde os machos apresentam duas AMT: (i) *perchers*, que permanecem pousados na vegetação à espera de fêmeas e os (ii) *fliers* que realizam atividade de procura por fêmeas ao longo das margens do riacho. Machos foram capturados, marcados e observações comportamentais foram realizadas anotando-se dados sobre a AMT adotada pelos machos. Todos os machos observados foram coletados e medidos em laboratório. As asas foram fotografadas e suas medidas foram utilizadas para análise de agilidade. Os resultados sugerem que machos *fliers* são maiores que os *perchers*, e o tamanho corporal foi positivamente correlacionado com a atividade de procura por acasalamento, característica dos *fliers*. Além disso, o coeficiente de agilidade dos *fliers* foi maior, indicando uma melhor habilidade de voo. Apesar disso, machos menores tiveram maior sucesso reprodutivo. Estes resultados sugerem que as estratégias adotadas pelos machos de *E. williamsoni* podem ser um reflexo da sua condição corporal e influenciar no sucesso reprodutivo dos machos. O estudo adiciona novas evidências sobre como a seleção sexual pode atuar em diferentes fenótipos de uma população e como diferentes táticas reprodutivas se relacionam com traços corporais como agilidade e tamanho corporal.

Palavras-chave: AMT, Odonata, comportamento, seleção sexual, agilidade

3.2 Abstract

Alternative mating tactics (AMT) are present in several animal taxa in order to respond to a physiological or environmental factor that affect its reproductive success. In other words, males can exhibit different tactics for mate acquisition. Here it is presented the case of *Epipleoneura williamsoni*, a non-territorial Neotropical damselfly on which males present AMT. Males from this species present two distinct AMT: (i) Perchers, which remain perched on the vegetation waiting for females and (ii) Fliers which perform activities of search for females across the margins of the stream. Males were captured, marked and behavioral observations were performed and notes were taken on the adopted AMT. All observed males were captured and taken to the laboratory for measurements. The wings were photographed and its measures used in agility analyzes. The results suggests that Flier males are larger than Perchers and body size were positively correlated with mate searching activity, a Flier characteristic. Moreover, the agility coefficient of Flier males were bigger, indicating a better flight ability. However, small Percher males had better reproductive success. These results suggests that the adopted strategies by *E. williamsoni* males can be a reflection of its body condition. The study add new evidences in how selection can act on different phenotypes within a population and how different AMT relates with body traits such as agility and body size.

Keywords: AMT, Odonata, behavior, sexual selection, agility

3.3 Introdução

Táticas alternativas de acasalamento (*alternative mating tactics*, AMT, Waltz, 1982) são apresentadas por diversos animais em razão de suas características fenotípicas para responder a um dado fator fisiológico ou ambiental que afeta o seu sucesso reprodutivo. Em outras palavras, machos com características fenotípicas diferentes podem exibir diferentes táticas para alcançar um objetivo comum: a obtenção de cópulas (Oliveira *et al.* 2008; Taborsky *et al.* 2008). Por exemplo, machos de algumas espécies de libélula podem ficar pousados à espera de fêmeas, enquanto outros procuram ativamente pelas potenciais parceiras (Hooper, 1999; Tsubaki, 2003); alguns grilos podem realizar chamados de advertência para fêmeas e outros não o fazem, procurando ativamente pelas fêmeas (Bertram, 2002); machos ápteros de abelhas (Andrenidae) possuem corpos robustos, o que faz com que copulem somente dentro dos ninhos, enquanto os machos alados são capazes de achar parceiras e copular durante os eventos de forrageio (Danforth, 1991). Esses comportamentos alternativos são frequentemente relacionados a traços corporais como coloração de advertência, estruturas morfológicas presentes no corpo e também o tamanho corporal (Oliveira *et al.* 2008).

Distinções no tamanho corporal de machos dentro de uma mesma população podem acarretar diferenças nas táticas reprodutivas apresentadas e também no seu sucesso reprodutivo, uma vez que o tamanho está frequentemente relacionado com a quantidade de reservas energéticas, essenciais às funções reprodutivas como defesa territorial e procura ativa por fêmeas (Emlen, 1996; Grether, 1996; Contreras-Garduño *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2008). Além do tamanho corporal, a agilidade é um atributo importante em voos de patrulha, por exemplo, onde manobras rápidas são executadas (Serrano-Meneses *et al.* 2008). Em espécies territoriais de

insetos alados, os machos necessitam defender potenciais locais de oviposição e lutar contra invasores, portanto machos mais ágeis podem obter maior sucesso reprodutivo por possuírem melhor manobrabilidade de voo (Serrano-Meneses *et al.* 2008).

Em Odonata, diversos estudos foram dedicados ao estudo das AMT (Fincke, 1985; Forsyth e Montgomerie, 1987; Wolf e Waltz, 1993; Tsubaki *et al.* 1997; Hooper *et al.* 1999; Cordero, 1999; Tsubaki, 2003) e mostraram que as táticas alternativas podem ser dependentes da condição física dos indivíduos, o que pode determinar a tática reprodutiva que será apresentada pelos machos (Wolf e Waltz, 1993; Guillermo-Ferreira e Del-Claro 2012; Córdoba-Aguilar e González-Tokman, 2014). Por exemplo, na espécie *Hetaerina americana* (Calopterygidae), o sucesso reprodutivo está relacionado com a habilidade dos machos em defender territórios através de lutas devido às suas reservas de gordura (Contreras-Garduño *et al.* 2006), essenciais na obtenção de energia em insetos (Arrese e Soulages, 2010). Machos com menores quantidades de gordura não conseguem defender um território e adotam uma estratégia não-territorial, vagueiam pelos territórios e evitam interações agonísticas com outros machos (Raihani *et al.* 2008; Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012).

Outros fatores como a densidade populacional (Cordero-Rivera, 1999; Córdoba-Aguilar e Cordero-Rivera, 2005), idade (Forsyth e Montgomerie, 1987) e a frequência fenotípica (Taborsky e Brockmann, 2010) podem determinar a AMT nos machos e consequentemente afetar o seu sucesso reprodutivo. Inclusive, um indivíduo pode alternar entre diferentes táticas ao longo de sua vida (Guillermo-Ferreira e Del-Claro 2011, Córdoba-Aguilar e Munguía-Steyer 2015). No caso da densidade populacional e sua relação com as táticas reprodutivas, excessivas lutas territoriais podem ocorrer e machos com táticas não territoriais conseguem atingir um

sucesso reprodutivo similar aos machos territoriais (Córdoba-Aguilar e Cordero-Rivera, 2005, Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2012). A idade também é um exemplo de fator que pode determinar a tática adotada por machos, uma vez que machos mais velhos perdem a capacidade de defesa constante de territórios por apresentarem níveis energéticos mais baixos em comparação com machos jovens, portanto apresentando táticas não territoriais como vagar pelos territórios à procura de fêmeas (Forsyth e Montgomerie, 1987; Guillermo-Ferreira e Del-Claro, 2011). As táticas podem também ser dependentes da frequência fenotípica que flutuam ao longo do tempo, selecionadas pelo ambiente, o que pode resultar na manutenção de diferentes fenótipos (Taborsky e Brockmann, 2010).

Entretanto, mesmo que estudos relacionados às AMT tenham sido realizados com Odonatos, faltam evidências sobre como traços corporais levam indivíduos de espécies não territoriais a apresentar diferentes táticas reprodutivas em uma mesma população, tendo em vista que não há competição por territórios e os machos raramente apresentam interações agonísticas. Portanto, neste estudo foi analisado se traços corporais como o tamanho e a agilidade podem prever a tática reprodutiva adotada por machos de *Epipleoneura williamsoni* (Odonata: Protoneurinae), uma espécie não territorial de ocorrência Neotropical, onde machos apresentam AMT. Nesta espécie, enquanto alguns machos permanecem pousados (i.e. *perchers*) e adotam uma tática de senta-e-espera para a obtenção de fêmeas, outros machos são ativos (i.e. *fliers*) (Corbet, 1999), voando ao longo das margens do riacho à procura de fêmeas, apresentando um comportamento de busca ativa. Portanto, esperou-se que o tamanho corporal e a agilidade dos machos podem determinar as suas táticas reprodutivas e consequentemente o seu sucesso reprodutivo, uma vez que estes aspectos já se mostraram determinantes na tática apresentada por

outros organismos em estudos anteriores (Emlen, 1996; Contreras-Garduño *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2008).

3.4 Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido na reserva do Clube de Caça e Pesca Itororó, em Uberlândia, Minas Gerais, Sudeste do Brasil (18°57' S, 48° 12' W) onde foi encontrada uma população de *E. williamsoni* em um riacho de aproximadamente 500 metros no interior da reserva (Figura 5). O riacho se situa em uma área de vereda que abriga diversas espécies de Odonata. Sua profundidade atinge 1m no ponto mais profundo e a vegetação marginal é composta por macrófitas e poáceas onde se formam pequenas piscinas que diversos machos foram encontrados.

Figura 5. Riacho presente na reserva do CCPIU, onde foi realizado o trabalho.

De janeiro a março de 2015, foram realizadas amostragens diárias de marcação e soltura pelo riacho. Machos foram marcados com uma numeração única na asa anterior direita com uma

caneta indelével. Machos de *E. williamsoni* não são territoriais e raramente exibem comportamentos agonísticos.

Comportamento de busca por acasalamento

Para descobrir se a atividade de busca por acasalamento é relacionada com o tamanho corporal, foram realizadas observações comportamentais em 40 machos por dez minutos cada, dividindo-os em duas categorias: (i) *perchers*, os machos que passam a maior parte do tempo pousados (>70% do tempo de observação); e (ii) *fliers*, machos que passam a maior parte do tempo voando em busca de fêmeas. O tamanho corporal dos machos foi medido com um paquímetro digital Western®PRO (0.01 mm) da ponta da cabeça ao fim do abdômen (excluindo os apêndices). O tamanho corporal foi usado como medida de condição do macho. Foram comparados então os tamanhos corporais de *perchers* e *fliers* e foi feita uma análise da correlação entre busca por acasalamento e tamanho corporal dos machos.

Para determinar a distância de deslocamento e, portanto, a tática de busca por acasalamento através do monitoramento da posição dos machos, foi delimitado um transecto de 150 metros com sessões de cinco metros no riacho (Figura 6). Machos foram então marcados com numeração única na asa anterior direita e sua posição dentro do transecto foi monitorada e anotada durante cada sessão de amostragem. Cada sessão teve duração de 60 minutos, com intervalo de 20 minutos entre as sessões, sendo três por dia de observação, durante 21 dias entre janeiro e março de 2015. Ao final de cada observação foi obtido o total em metros deslocados por cada macho marcado e recapturado.

Figura 6. Pontos do transecto delimitado no riacho, mostrando as marcações a 25 (a), 50 (b) e 100 metros (c). Estacas foram colocadas a cada 25 metros, e as demais marcações foram feitas com fitas amarradas à vegetação marginal.

AMT e sucesso reprodutivo

Para determinar se o tamanho corporal e as táticas adotadas pelos machos se relacionam com o sucesso reprodutivo, casais em cópula foram coletados e medidos. Desta forma, é esperado que o tamanho e a tática reprodutiva adotada por machos em cópula sejam diferentes em relação a machos que não copularam.

Agilidade

Para a análise da agilidade dos machos *fliers* e *perchers*, foi adotado um método de estimativa pela morfologia das asas (Serrano-Meneses *et al.* 2008). A asa posterior direita dos machos observados foi fotografada e, pelo raio do segundo momento de área de asa ($r^2(S)$, Ellington 1984) da asa, foi estimada a agilidade dos machos utilizando o programa ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, 2005) seguindo um protocolo descrito por Serrano-Meneses *et al.* (2008). A métrica $r^2(S)$ é proporcional à raiz quadrada das forças aerodinâmicas responsáveis pelos movimentos de bater e girar as asas (Serrano-Meneses *et al.* 2008). Indivíduos com valores baixos de $r^2(S)$ são interpretados como mais habilidosos no voo, enquanto valores maiores de $r^2(S)$ indicam indivíduos com menor habilidade e manobrabilidade no voo (Ellington, 1984; Serrano-Meneses *et al.* 2008).

Análises estatísticas

A correlação entre tamanho corporal dos machos e a atividade de busca por acasalamento foi analisada utilizando o teste de Spearman. O tamanho corporal dos *perchers* e patrulhadores foi comparado utilizando o teste t-Student. A relação entre os traços corporais dos machos (i.e. tamanho corporal e agilidade) e as táticas reprodutivas adotadas foi analisada com um Modelo Linear Generalizado (GLM), definindo os traços corporais dos machos como variáveis dependentes e táticas reprodutivas como variável preditora. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa STATISTICA 10.1.

3.5 Resultados

Comportamento de busca por acasalamento

Machos *fliers* foram maiores que machos *perchers* ($32.2 \pm 0.69\text{mm}$ e $31.1 \pm 0.3\text{mm}$ respectivamente; teste t-Student, $t = 4.0838$, $p = 0.0001$, $n = 40$; Figura 7). O tamanho corporal foi positivamente correlacionado com a atividade de busca por acasalamento (coeficiente de correlação de Spearman $r_s = 0.8935$; $t = 12.2683$; $p = 0.0001$, $n = 40$; Figura 8).

Figura 7. Diferença de tamanho corporal entre os machos que adotaram as táticas *percher* e *flier*. O tamanho dos *fliers* foi significativamente maior quando comparado aos *perchers*.

Morfologia das asas

O tamanho dos machos foi negativamente correlacionado com o coeficiente de agilidade $r^2(S)$, indicando assim que machos maiores possuem melhor manobrabilidade e habilidade de voo (Regressão múltipla $\beta = 0.1511$, $t = -2.4075$, $p = 0.02$; Figura 9). A tática reprodutiva adotada pelos machos é dependente do tamanho corporal, mas não de sua agilidade (Tabela 2).

Figura 9. A relação entre o tamanho corporal dos machos e o coeficiente de agilidade $r^2(S)$, indicando que machos maiores possuem maior manobrabilidade de voo.

Tabela 2. Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLM) mostrando a relação entre as táticas reprodutivas adotadas pelos machos (*percher* e *flier*) com os traços corporais. Resultados significativos em negrito.

Tática reprodutiva	Agilidade			Tamanho corporal		
	MS	F	<i>P</i>	MS	F	<i>P</i>
	0.5445	3.6925	0.062	4.5422	30.80	0.0003

3.6 Discussão

Os resultados obtidos mostraram que machos *fliers* são maiores que machos *perchers*. Os resultados também indicam que a atividade de procura por acasalamento é positivamente correlacionada com o tamanho corporal. Em outras palavras, machos maiores são mais ativos e cobrem maiores distâncias de voo na busca por parceiras. A teoria das AMT prediz que táticas diferentes requerem demandas energéticas diferentes (Cummings e Gelineau-Kattner, 2009) e, portanto, podem selecionar diferentes adaptações fisiológicas de voo de acordo com o tamanho corporal. É sabido que, para artrópodes (Lease and Wolf 2011), incluindo libélulas (Córdoba-Aguilar and González-Tokman 2014), machos maiores possuem maior quantidade de gordura que é o combustível para voo. Consequentemente, conseguem voar por períodos de tempo maiores e cobrir maiores distâncias, o que geralmente culmina em maior sucesso reprodutivo (Therry *et al.* 2014). No caso de *E. williamsoni*, machos menores provavelmente adotaram a estratégia de sentar e esperar devido à limitações fisiológicas que inibem voar por longos períodos e distâncias, enquanto machos maiores têm maior reserva de gordura e conseguem adotar uma AMT *flier*.

Além disso, os resultados mostraram que *fliers* possuem maior agilidade e manobrabilidade de voo, comparados aos *perchers*. Estes resultados indicam que a tática adotada pelos machos pode ser influenciada não apenas pela sua condição corporal, mas também pela maior capacidade de dispersão de machos com maior habilidade de voo. Por exemplo, em voos de patrulha onde manobras rápidas são executadas (Serrano-Meneses *et al.* 2008). No entanto, em espécies não-territoriais machos geralmente devem buscar ativamente pelas fêmeas. Neste caso, a evidência sugere uma vantagem a machos com tamanho corporal menor devida à alta

agilidade e manobrabilidade durante o voo (Carchini *et al.* 2000, Crompton *et al.* 2003, Blackenhorn 2005). Por exemplo, a relação negativa entre tamanho corporal e sucesso reprodutivo na espécie não-territorial *Ischnura elegans* (Carchini *et al.* 2000) e *Lestes sponsa* (De Block e Stoks, 2007) sugere um possível papel da agilidade do macho na seleção sexual. Mesmo assim, a vantagem de machos menores é predita para ocorrer em espécies onde os machos tem de competir pelos recursos disponíveis, nas quais eles buscam ativamente por fêmeas (Ghiselin 1974, Reiss 1989), como nas espécies de libélula estudadas (Carchini *et al.* 2000, De Block e Stoks, 2007), mas nada ainda é sabido para espécies não-territoriais com táticas reprodutivas de sentar-e-esperar (i.e. *perchers*).

Em espécies territoriais de Odonata, os machos necessitam defender potenciais locais de oviposição e lutar contra invasores. Neste caso, machos menores e mais ágeis, podem adquirir maior sucesso reprodutivo por possuírem um voo mais ágil e energeticamente econômico (Serrano-Meneses *et al.* 2008). No entanto, como os resultados obtidos neste estudo indicam, este padrão não ocorre em *E. williamsoni*, pois os *fliers* (i.e. machos maiores) obtiveram maior índice de agilidade. Machos de espécies não-territoriais geralmente procuram ativamente por fêmeas (Fincke, 1982; Corbet, 1999) e os resultados aqui obtidos sugerem que a tática *percher* exibida por alguns machos de *E. williamsoni* pode também estar relacionada com sua menor habilidade de voo. Portanto, em espécies não-territoriais, provavelmente ocorra um padrão inverso ao de espécies territoriais.

Finalmente, mesmo com uma condição de agilidade inferior, os machos *perchers* obtiveram maior sucesso reprodutivo. Além da condição física, outros fatores podem também estar relacionados com as diferentes táticas reprodutivas: a densidade populacional (Tsubaki e

Ono, 1986, 1987; Oliveira *et al.* 2008) e a variação ambiental (Boyce e Perrins, 1987; Freeman e Herron, 2007). Portanto, a frequência dos fenótipos (i.e. AMTs) na população pode ser determinada pelo sucesso reprodutivo diferenciado em diferentes condições do ambiente social (Tsubaki *et al.* 1997). Outro possível cenário é o da variação ambiental, onde as diferenças sazonais influenciam no tamanho corporal dos indivíduos (Córdoba-Aguilar *et al.* 2009) e, conseqüentemente, sua tática reprodutiva. Na região Neotropical, geralmente gerações diferentes se sobrepõem devido ao clima favorecendo um rápido desenvolvimento (Corbet, 1999). Indivíduos de uma geração anterior, que levaram mais tempo para se desenvolver no estágio larval, geralmente são maiores se comparados à indivíduos que se desenvolveram e emergiram em uma mesma estação (Córdoba-Aguilar *et al.* 2009). Essa diferença no desenvolvimento pode conferir diferenças fisiológicas e morfológicas aos machos, que de acordo com suas limitações, buscam se reproduzir adotando táticas alternativas (Córdoba-Aguilar *et al.* 2009).

Estudos futuros, com o acompanhamento da população ao longo de repetidas estações, poderão se avaliar se há flutuações na frequência das duas táticas, fornecendo mais evidências sobre como elas se mantêm na população. Fatores ecológicos podem ser determinantes na seleção dos fenótipos, pois variam de forma considerável no tempo ou espaço, mudando assim a intensidade e a direção da seleção nos indivíduos (Gosden e Svensson, 2008; Kasumovic *et al.* 2008; Punzalan *et al.* 2010). Por exemplo, na área de estudo deste trabalho formam-se remansos ao longo das margens do riacho na estação chuvosa, local onde eram encontrados os machos *perchers*. As condições demográficas na estação seca podem não ser as mesmas em relação à disposição desses remansos que podem se tornar escassos ou inexistentes, alterando a composição marginal do riacho utilizada por *perchers* e favorecendo machos que adotam uma tática dispersiva (i.e. *fliers*). Em conclusão, o presente estudo trouxe novas evidências sobre

como a seleção pode atuar em diferentes fenótipos de uma população e como diferentes táticas reprodutivas se relacionam com traços corporais como agilidade e tamanho corporal.

3.7 Referências bibliográficas

- Alcock, J. (1993). Animal behavior: An evolutionary approach . Sinauer Associates.
- Arrese, E. L., e Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annual review of entomology, 55, 207.
- Bertram, S. M. (2002). Temporally fluctuating selection of sex limited signaling traits in the Texas field cricket, *Gryllus texensis*. Evolution 56, 1831–1839.
- Blanckenhorn, W. (2005). Behavioral causes and consequences of sexual size dimorphism. Ethology 111:977–1016.
- Boyce, M. S.; Perrins, C. M.. (1987). Optimizing Great Tit Clutch Size in a Fluctuating Environment. Ecology, 68(1), 142–153. <http://doi.org/10.2307/1938814>
- Campanella, P. J.; Wolf, L. L. (1974). Temporal leks as a mating system in a temperate zone dragonfly (Odonata: Libellulidae) *Plathemis lydia*. Behaviour 51, 49–87.
- Carchini, G., Chiarotti, F., Di Domenico, M. & Paganotti, G. (2000). Fluctuating asymmetry, size and mating success in males of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Odonata: Coenagrionidae). Animal Behaviour, 59, 177e182.
- Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J, e Córdoba-Aguilar A. (2006). Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. Journal of Ethology, 24:165-173.[doi:10.1007/s10164-005-0177-z](https://doi.org/10.1007/s10164-005-0177-z)
- Corbet, P. S. (1999). Dragonflies: behaviour and ecology of Odonata. Harley Books.

Cordero, A. (1999). Forced copulations and female contact guarding at a high male density in a calopterygid damselfly. *Journal of Insect Behavior* 12, 27–37.

Córdoba-Aguilar, A., Jiménez-Cortés, J. G., e Lanz-Mendoza, H. (2009). Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response, and survival in males of a territorial insect. *Ecological Entomology*, 34(2), 228-239.

Córdoba-Aguilar A, González-Tokman DM (2014) The Behavioral and Physiological Ecology of Adult Rubyspot Damselflies (Hetaerina, Calopterygidae, Odonata).

Córdoba-Aguilar, A., Munguía-Steyer, R. (2015). Be or not to be? Mating success and survival trade-offs when switching between alternative reproductive tactics. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(11): 2119-2124.

Crompton, B., Thomason, J. C. & McLachlan, A. (2003). Mating in a viscous universe: the race is to the agile, not to the swift. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270, 1991e1995.

Cummings, M. E., e Gelineau-Kattner, R. (2009). The energetic costs of alternative male reproductive strategies in *Xiphophorus nigrensis*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(10), 935-946.

Danforth, B.N. (1991). The morphology and behavior of dimorphic males in *Perdita portalis* (Hymenoptera: Andrenidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 29, 235–247.

De Block, M., & Stoks, R. (2007). Flight-related body morphology shapes mating success in a damselfly. *Animal behaviour*, 74(4), 1093-1098.

Fincke, O. M. (1982). Lifetime mating success in a natural population of the damselfly, *Enallagma hageni* (Walsh)(Odonata: Coenagrionidae). Behavioral Ecology and Sociobiology, 10(4), 293-302.

Fincke, O. M. (1985). Alternative mate-finding tactics in a non-territorial damselfly (Odonata: Coenagrionidae). Animal behaviour, 33(4), 1124-1137.

Forsyth, A., Montgomerie, R. D. (1987). Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly *Calopteryx maculata*: sneaking by older males. Behavioral Ecology and Sociobiology, 21(2), 73-81.

Freeman, S.; Herron, J.C. (2007). Variation among individuals. Em: Evolutionary Analysis, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. pp.147-178.

Ghiselin, M.T. (1974). The economy of nature and the evolution of sex. Berkeley: Univ. California Press.

Gosden, T. P., & Svensson, E. I. (2008). Spatial and temporal dynamics in a sexual selection mosaic. Evolution, 62(4), 845-856.

Guillermo-Ferreira, R., e Del-Claro, K. (2012). Territoriality and male-biased sexual size dimorphism in *Argia reclusa* (Odonata: Zygoptera). Acta Ethologica, 15(1), 101-105.

Grether GF. (1996). Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *hetaerina americana*. *Evolution*, 50: 1939-1948.

Hooper, R. E., Tsubaki, Y., and Siva-Jothy, T. (1999). Expression of a costly, plastic secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiological Entomology* 24, 364–369.

Kasumovic, M. M., Bruce, M. J., Andrade, M. C., & Herberstein, M. E. (2008). Spatial and temporal demographic variation drives within-season fluctuations in sexual selection. *Evolution*, 62(9), 2316-2325.

Lease H.M., Wolf B.O. (2011). Lipid content of terrestrial arthropods in relation to body size, phylogeny, ontogeny and sex. *Physiol Entomol* 36:29–38. doi: 10.1111/j.1365-3032.2010.00767.x

Oliveira R.F., Taborsky M., Brockmann H.J. (2008). Alternative reproductive tactics an integrated approach. Cambridge University Press, pp. 519.

Punzalan, D., Rodd, F. H., & Rowe, L. (2010). Temporally variable multivariate sexual selection on sexually dimorphic traits in a wild insect population. *The American Naturalist*, 175(4), 401-414.

Raihani, G., Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A. (2008). Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Animal Behaviour*, 75(6), 1851-1860.

Reiss, M.J. (1989). *The Allometry of Growth and Reproduction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A., e Székely, T. (2008). Sexual size dimorphism: patterns and processes. Em: Dragonflies and damselflies: model organisms for ecological and evolutionary research. Oxford University Press, Oxford, 231-248.

Sokolovska, N., Rowe, L., Johansson, F. (2000). Fitness and body size in mature odonates. *Ecological Entomology*, 25(2), 239-248.

Switzer, P. V. (2002). Territory quality, habitat selection, and competition in the amberwing dragonfly, *Perithemis tenera* (Odonata: Libellulidae): Population patterns as a consequence of individual behavior. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 145-157.

Taborsky, M., Oliveira, R. F., e Brockmann, H. J. (2008). The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions. Em: Alternative reproductive tactics: an integrative approach, 1-21.

Taborsky, M., Brockmann, H. J. (2010). Alternative reproductive tactics and life history phenotypes. Em: Animal behaviour: evolution and mechanisms (pp. 537-586). Springer Berlin Heidelberg.

Therry L, Gyulavári H.A., Schillewaert S. (2014). Integrating large-scale geographic patterns in flight morphology, flight characteristics and sexual selection in a range-expanding damselfly. *Ecography*. doi: 10.1111/ecog.00630

Tsubaki, Y., e Ono, T. (1986). Competition for territorial sites and alternative mating tactics in the dragonfly, *Nannophya pygmaea* Rambur (Odonata: Libellulidae). *Behaviour*, 97(3), 234-252.

Tsubaki, Y., e Ono, T. (1987). Effects of age and body size on the male territorial system of the dragonfly, *Nannophya pygmaea* Rambur (Odonata: Libellulidae). *Animal Behaviour*, 35(2), 518-525.

Tsubaki, Y. (2003). The genetic polymorphism linked to matesecuring strategies in the male damselfly *Mnais costalis* Selys (Odonata: Calopterygidae). *Population Ecology* 45, 263–266.

Tsubaki, Y., Hooper, R. E., Siva-Jothy, T. (1997). Differences in adult and reproductive lifespan in the two male forms of *Mnais pruinosa costalis* (Selys) (Odonata: Calopterygidae). *Researches on Population Ecology* 39, 149–155.

Waltz, E. C. (1982). Alternative mating tactics and the law of diminishing returns: the satellite threshold model. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 10(2), 75-83.

Wolf, L.L., Waltz, E. C. (1993). Alternative mating tactics in male white-faced dragonflies: experimental evidence for a behavioural assessment ESS. *Animal Behaviour* 46, 325– 334.