

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

Raquel Almeida Marques

Taxonomia e Filogeografia de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta:
Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) no Brasil

Rio de Janeiro

2022

Raquel Almeida Marques

Taxonomia e Filogeografia de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta:
Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical).

Orientador: Prof. Dr. Allan Paulo Moreira dos Santos

Rio de Janeiro

2022

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

MM298 Marques , Raquel Almeida
Taxonomia e Filogeografia de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) no Brasil / Raquel Almeida Marques . -- Rio de Janeiro, 2022.
69

Orientador: Allan Paulo Moreira dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.

1. Insetos Aquáticos. 2. DNA Barcode. 3. Região Neotropical . I. Santos, Allan Paulo Moreira dos, orient. II. Título.


Raquel Almeida Marques

**TAXONOMIA E FILOGEOGRAFIA DE BLEPHAROPUS DIAPHANUS KOLENATI,
1859 (INSECTA: TRICHOPTERA: HYDROPSYCHIDAE: MACRONEMATINAE) NO
BRASIL**

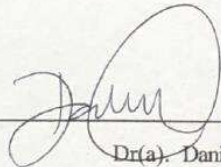
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Biológicas.

Aprovada em 05 de agosto de 2022.

Banca Examinadora



Dr(a). Allan Paulo Moreira dos Santos (Orientador)
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)



Dr(a). Daniela Macda Takiya
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)



Dr(a). Igor Christo Miyahira
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

Taxonomia e Filogeografia de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta:
Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) no Brasil

Raquel Almeida Marques

Orientador: Prof. Dr. Allan Paulo Moreira dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical).

Banca examinadora:

Prof. Dr. Allan Paulo Moreira dos Santos

Prof. Dr. Igor Christo Miyahira

Prof^a. Dr^a. Daniela Maeda Takiya

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Allan por toda a ajuda e paciência durante todo o processo de elaboração dessa dissertação. Obrigada por todos os ensinamentos desde o começo da iniciação científica.

À UNIRIO, ao PPGGIO e aos meus professores que proporcionaram a minha formação.

Aos meus colegas de laboratório, do LabSIN e do LABENT pela ajuda, principalmente ao Pedro e ao André (Alfafa) por auxiliarem no transporte de material e esse último também por me permitir utilizar suas fotos neste trabalho.

Aos curadores das coleções que, gentilmente, emprestaram material e/ou dados dos espécimes utilizados no estudo.

Ao Gleison Desidério e Ana Pes (INPA) e a Dani (LABENT) pelo auxílio, tanto com material quanto com conhecimentos e esclarecimentos.

Aos membros da banca de avaliação pelos comentários e sugestões que contribuirão muito para esse trabalho e para minha formação.

Aos projetos que financiaram esse projeto.

À minha família e amigos, pelo apoio.

RESUMO

Taxonomia e Filogeografia de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) no Brasil

Raquel Almeida Marques

Orientador: Prof. Dr. Allan Paulo Moreira dos Santos

Blepharopus Kolenati, 1859 é um gênero monotípico endêmico da América do Sul. Sua única espécie, *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 é registrada na Argentina, Brasil e Venezuela, uma distribuição geográfica ampla. No Brasil, essa espécie ocorre em diferentes biomas, como as florestas tropicais Amazônia e Mata Atlântica, bem como no Cerrado e na Caatinga. Neste estudo, foram utilizadas sequências de um fragmento do gene codificante da citocromo oxidase I (COI) e observadas características de adultos e larvas para analisar sua diversidade morfológica e molecular em sua vasta distribuição no Brasil. 43 sequências de COI foram obtidas para espécimes de *Blepharopus* e 5 sequências foram adquiridas do GenBank®. 58 sequências de outros hidropsíquídeos foram usadas como grupos externos, gerando uma matriz total de 106 sequências e 658 pb. As seguintes análises foram realizadas usando os dados de COI: distâncias par-a-par K2P, neighbor-joining, inferência Bayesiana e dois métodos de delimitação de espécies – Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) e Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC). Além disso, redes de haplótipos foram calculadas usando os biomas, regiões hidrográficas e províncias biogeográficas como unidades geográficas. Os resultados revelaram altas distâncias intraespecíficas entre as sequências de *Blepharopus* (até 22.8%), refletidas na análise de ABGD, que recuperou nove potenciais espécies e um *barcode gap* evidente. As análises de GMYC indicaram sete espécies potenciais. Por outro lado, os grupos definidos com base nas sequências de DNA não foram corroborados por diferenças morfológicas claras em caracteres normalmente utilizados na taxonomia de tricópteros, tais como a venação alar, o padrão de cor e a genitália masculina. Nas análises filogeográficas, não foi observada nenhuma estruturação geográfica para a diversidade genética estudada. Baseando-se nas divergências genéticas, na delimitação de espécies e estudo morfológico, podemos concluir que *Blepharopus diaphanus* representa, de fato, um complexo de espécies crípticas.

Palavras-chave. Insetos aquáticos, DNA barcode, Região Neotropical

ABSTRACT

Taxonomy and phylogeography of *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) in Brazil

Raquel Almeida Marques

Advisor: Prof. Dr. Allan Paulo Moreira dos Santos

Blepharopus Kolenati, 1859 is a monotypic genus endemic to the South America. The only known species, *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859, is recorded from Argentina, Brazil, and Venezuela, a wide geographic distribution. In Brazil, it occurs in different biomes, such as the Amazon and the Atlantic forests, both tropical rainforests, and in Cerrado and Caatinga biomes, both with savanic vegetation. Here, we used sequences of a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene and observed adult and larval characteristics to study morphological and molecular diversity along vast distribution of *B. diaphanus* in Brazil. 43 COI sequences were generated for specimens of *Blepharopus* and other 5 sequences were gathered from GenBank®. 58 sequences of other hydropsychids were used as outgroups, resulting in a matrix with 106 sequences and 658 bp. K2P pairwise distances, neighbor-joining, Bayesian inference, and two methods for species delimitation: the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) were performed using the COI dataset. In addition, haplotype networks were calculated using Brazilian biomes, hydrographic regions, and biogeographic provinces as geographic units respectively. The results showed high intraspecific K2P distances among *Blepharopus* sequences (up to 22.8%), reflected in the ABGD analysis, which recovered nine potential species, with a clear barcode gap. GMYC analysis indicated a total of seven potential species. On the other hand, groups based on molecular data were not corroborated by clear morphological differences in characters commonly used in caddisfly taxonomy, such as wing venation, color pattern, and male genitalia. In phylogeographic analysis, it was not observed any geographic structure for the genetic diversity studied. Based on the genetic distances, species delimitation and morphological study we can conclude that *Blepharopus diaphanus* represent, in fact, a complex of cryptic species.

Key words. Caddisfly, aquatic insects, DNA barcode, Neotropics

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Larva de <i>Leptonema</i> Guérin-Méneville, 1843 (Hydropsychidae: Macronematinae) (F. Salles).....	2
Figura 2. Adulto de <i>Marilia</i> Müller, 1880 (Odontoceridae) (A. Alves).....	4
Figura 3. A. Rede de captura e abrigo de <i>Hydropsyche</i> Curtis, 1835 (Hydropsychidae: Hydropsychinae) (W. Graf., Morse et al. 2019).....	4
Figura 4. Casa tubular portátil de <i>Grumichella</i> Müller, 1879 (Leptoceridae: Grumichellinae) (F. Salles).....	5
Figura 5. Adulto de <i>Blepharopus diaphanus</i> Kolenati, 1859 (Hydropsychidae: Macronematinae) (F. Salles).....	7

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa da América do Sul com as localidades dos espécimes de <i>B. diaphanus</i> analisados distribuídos nas províncias biogeográficas propostas por Morrone et al. (2022) (Figure 1. South America map with localities of the analyzed specimens of <i>B. diaphanus</i> distributed on the biogeographic provinces proposed by Morrone et al. (2022).)	20
Figura 2. Mapa da América do Sul com as localidades dos espécimes de <i>B. diaphanus</i> analisados distribuídos nos biomas brasileiros. (Figure 2. South America map with localities of the analyzed specimens of <i>B. diaphanus</i> distributed on the Brazilian biomes.).....	20
Figura 3. <i>Blepharopus diaphanus</i> , asas do macho. A. Asa anterior. B. Asa posterior. (Figure 3. <i>Blepharopus diaphanus</i> , male wings. A. Forewing. B. Hind wing.).....	27
Figura 4. <i>Blepharopus diaphanus</i> , macho adulto. A. Habitus, vista dorsal. B. Cabeça e tórax, vista dorsal. C. Asa anterior. D. Genitália masculina, vista ventral. E. Genitália masculina, vista lateral. F. Genitália masculina, vista dorsal. (Figure 4. <i>Blepharopus diaphanus</i> , adult male. A. Habitus, dorsal view. B. Head and thorax, dorsal view. C. Forewing. D. Male genitalia, ventral view. E. Male genitalia, lateral view. F. Male genitalia, dorsal view.)	28

Figura 5. <i>Blepharopus diaphanus</i> , fêmea adulta. A. Habitus, vista dorsal. B. Cabeça, vista dorsal. C. Cabeça, vista lateral. (Figure 5. <i>Blepharopus diaphanus</i> , adult female. A. Habitus, dorsal view. B. Head, dorsal view. C. Head, lateral view.)	29
Figura 6. <i>Blepharopus diaphanus</i> A. Larva habitus, vista lateral. B. Cabeça, vista dorsal. C. Cabeça, em vista lateral. D. Pernas torácicas, vista dorsal. E. Mandíbulas, vista dorsal. F. Tórax, em vista dorsal. G. Oitavo e nono segmento, em vista ventral. (Figure 6. <i>Blepharopus diaphanus</i> A. Larva, habitus, lateral view. B. Head, dorsal view. C. Head, lateral view. D. Thoracic legs, dorsal view. E. Mandibles, dorsal view. F. Thoracic nota, dorsal view. G. Eighth and ninth sterna, ventral view.)	30
Figura 7. Árvore de Neighbor-Joining baseada nas distâncias K2P das sequências de COI de <i>Blepharopus diaphanus</i> e outras espécies de Macronematinae. Valores de Bootstrap acima de 50% estão representados próximos aos ramos. (Figure 7. Neighbor joining tree based on K2P distances of COI sequences of <i>Blepharopus diaphanus</i> and other Macronematinae species. Bootstrap values above 50% are represented near the branches.).....	32
Figura 8. Hipótese filogenética derivada da Inferência Bayesiana (árvore de consenso da maioria, InL = -9052.559) baseada nas sequências de COI de <i>Blepharopus diaphanus</i> e outros Macronematinae. Valores de probabilidade posterior (PP) estão próximos aos ramos. Barras à direita representam as potenciais espécies propostas pelas análises ABGD (barra verde) e GMYC (barra vermelha), respectivamente (Figure 8. Phylogenetic hypothesis derived from Bayesian inference (50% majority-rule consensus tree, InL = -9052.559) based on COI sequences of <i>Blepharopus diaphanus</i> and other Macronematinae species. Posterior probability (PP) values are provided above branches. Bars in the right represent the potential species recovered by ABGD (green bar) and GMYC analysis (red bar), respectively.)	33
Figura 9. Histograma de comparações par-a-par de divergências K2P entre sequências de COI de <i>Blepharopus diaphanus</i> . A seta vermelha indica o <i>barcode gap</i> entre valores baixos e altos de distâncias K2P. (Figure 9. Histogram of the number of pairwise comparisons for K2P divergences among COI sequences of <i>Blepharopus diaphanus</i> . The red arrow indicates the (“barcode”) gap between low and high values of K2P distances.).....	34

Figura 10. Rede de haplótipos de sequências de COI de *Blepharopus diaphanus*. As cores indicam as províncias biogeográficas (Morrone et al. 2022) de ocorrência dos haplótipos de acordo com a legenda. O tamanho dos círculos está relacionado à frequência dos haplótipos e os traços nos ramos representam o número de mutações entre eles. (Figure 10. Haplotype network of COI sequences of *B. diaphanus*. Colors indicate biogeographic provinces (Morrone et al. 2022) for occurrence of haplotypes according to legend. Size of circles are related to the frequency of haplotypes and dashes on branches represent the number of mutations between haplotypes.)34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores usados no presente trabalho e suas referências. (Table 1. Primers used in the present work and their reference.).....	21
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Ordem Trichoptera.....	1
Família Hydropsychidae e Subfamília Macronematinae.....	5
Gênero <i>Blepharopus</i> Kolenati, 1859	6
Técnicas moleculares em estudos taxonômicos.....	8
OBJETIVOS.....	9
DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 1 - COI sequences reveal cryptic diversity in the caddisfly <i>Blepharopus diaphanus</i> Kolenati, 1859 (Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae) in Brazil	15
1. Introduction	16
2. Methods	18
2.1. Material examined and morphological study	18
2.2. DNA extraction, amplification, sequencing, and alignment.....	19
2.3. Genetic and phylogenetic analyses	21
2.4. Species delimitation and phylogeographic analyses	22
3. Results	22
3.1. Taxonomy	22
3.2. Molecular analysis	31
4. Discussion.....	35
4.1. Morphological diversity.....	35
4.2. Molecular diversity	35
5. Conclusions	37
6. References	38
7. Supplementary material.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

INTRODUÇÃO GERAL

Ordem Trichoptera

Os tricópteros compõem a ordem mais diversa dentre os insetos primariamente aquáticos (Neboiss 1991), ocorrendo majoritariamente em ambientes de água-doce, com exceção de poucas espécies marinhas e outras terrestres (Riek 1976). Atualmente, são conhecidas mais de 16.000 espécies no mundo, alocadas em 51 famílias e 618 gêneros (Morse *et al.* 2019). Estão distribuídos em sete regiões biogeográficas, não tendo espécies registradas apenas no continente Antártico. As regiões Oriental e Neotropical detêm juntas mais da metade das espécies conhecidas, esta última registrando mais de 3.000 espécies (De Moor & Ivanov 2008, Morse *et al.* 2019).

A ordem é recuperada como grupo-irmão de Lepidoptera, formando a superordem Amphiesmenoptera, em estudos baseados tanto em caracteres morfológicos quanto moleculares (Wheeler *et al.* 2002, Trautwein *et al.* 2012, Misof *et al.* 2014). Os integrantes desse grupo possuem uma série de sinapomorfias, dentre as quais as asas cobertas por cerdas, modificadas em escamas nas mariposas e borboletas, característica que dá nome à superordem. Além disso, os anfiesmenópteros compartilham a hipofaringe e o pré-lábio fusionados e uma abertura para glândulas produtoras de seda, utilizadas pelas larvas para produzirem casulos, como nos lepidópteros, ou abrigos e redes de captura, no caso dos tricópteros (Kristensen 1984, Holzenthal *et al.* 2007).

Os tricópteros são insetos holometábolos, em que suas formas imaturas (ovo, larva e pupa) vivem em ambientes aquáticos, tanto lóticos quanto lênticos, enquanto o adulto é aéreo-terrestre. Em regiões temperadas, eles geralmente apresentam uma geração por ano (univoltinos) usualmente com período médio de três semanas (Wiggins 1996). Os ovos são normalmente dentro da água e possuem formato esférico ou alongado (Morse 2003).

A fase larval (Fig. 1) constitui a etapa mais longa de vida de um tricóptero, num total de cinco ínstars. Nesse estágio, o aparelho bucal é bem desenvolvido, as antenas são curtas, alguns grupos possuem brânquias abdominais e no último segmento abdominal está presente um par de falsas pernas anais com garras (Holzenthal *et al.* 2007). A partir das glândulas salivares modificadas é produzida a seda, empregada na construção de abrigos, casas e redes de captura de alimento, junto com detritos minerais, folhas e galhos encontrados no ambiente (Pes *et al.* 2018). A diversificação na utilização da seda pelas larvas de tricópteros permitiu a esses insetos ocuparem diferentes nichos ecológicos

(Mackay & Wiggins 1979). Aqueles que constroem casas portáteis tubulares, mais popularmente conhecidas, apresentam maior eficiência respiratória, através de uma corrente de água constante dentro de seu abrigo promovida por sua ondulação abdominal. Ainda, com a possibilidade de abrigos móveis e redes de captura, as larvas diversificaram seus grupos tróficos, podendo ser predadoras, raspadoras, coletoras ou trituradoras (Cummins 1973, Wiggins 1996).



Figura 1. Larva de *Leptonema* Guérin-Ménéville, 1843 (Hydropsychidae: Macronematinae) Foto:F. Salles.

As pupas são exaratas, possuem escleritos abdominais com ganchos e apesar de alguma semelhança com os adultos, diferem por conta das mandíbulas funcionais e desenvolvidas (Hickin 1967). Os adultos (Fig. 2) compõem a fase de vida mais curta, vivendo associados à vegetação ripária, assemelham-se a pequenas mariposas e a maioria é noturna ou crepuscular. Possuem de 1.5 mm a 4.5 cm e normalmente, com coloração amarronzada, amarelada ou cinzenta, porém algumas espécies apresentam asas cobertas por cerdas e/ou escamas coloridas, formando um padrão distinto. Apesar da pouca duração da fase adulta, em termos taxonômicos, é aquela com maior relevância, uma vez que por meio das genitálias dos machos adultos é que geralmente são identificadas as espécies (Holzenthall & Calor 2017).

Os tricópteros se dividem em duas subordens, consistentemente recuperadas como monofiléticas: Integripalpia e Annulipalpia (Kjer *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2020). A maioria dos Annulipalpia constrói abrigos fixos ao substrato usando seda e detritos e/ou outros fragmentos do ambiente, muitas vezes produzindo também redes de captura de alimentos (Fig. 3). Essa rede funciona como um filtro no qual partículas finas ou mais grossas são retidas quando transportadas pela água corrente. Os Integripalpia, por outro lado, fabricam casas tubulares portáteis com seda (Fig. 4), as quais podem ter diversos materiais adicionados, como folhas, grãos minerais, algas etc. Provavelmente essas casas possibilitaram a ocupação de ambientes lênticos, com menores concentrações de oxigênio, à medida que ondulações abdominais geram correntes de água através dos tubos, oxigenando as brânquias (Wiggins 1996, Thomas *et al.* 2020).

Cinco famílias, antigamente classificadas em Spicipalpia, uma terceira subordem, apresentam diferentes tipos de construção de abrigos (Hydroptilidae, Glossosomatidae, Hydrobiosidae, Ptilocolepidae e Rhyacophilidae) e têm posicionamento filogenético ainda incerto. Algumas análises recuperam tais famílias como as primeiras linhagens a divergir dentro da ordem (Malm *et al.* 2013), mas outras análises as recuperam como linhagens dentro de Integripalpia (Kjer *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2020), mas em ambos os casos, formando um grupo parafilético.

Os tricópteros possuem extrema importância para os ambientes de água-doce, já que seus imaturos são componentes essenciais do fluxo de energia nesses ecossistemas devido às suas diferentes estratégias alimentares e sua abundância (Morse *et al.* 2019). Eles podem processar grande parte dos recursos do ambiente, deixando-os disponíveis para outros seres, além dos próprios servirem de alimento para animais maiores (Morse 2003). Além disso, devido à diversidade, à abundância e à tolerância diferenciada das espécies à poluição ou outros impactos antrópicos, esses insetos são comumente usados em estudos de biomonitoramento da qualidade da água (Lenat 1993). Como a poluição de rios e córregos vem diminuindo a disponibilidade de água-doce para o consumo humano e a fauna desses ambientes, o uso de larvas de tricópteros, assim como de outros macroinvertebrados, é uma técnica fundamental que deveria ser aprimorada e mais explorada na região Neotropical (Bonada *et al.* 2006). Os imaturos também podem ser potencialmente usados, inclusive, para monitorar poluição por radioatividade após acidentes nucleares (Ueno *et al.* 2018) e para auxiliar em casos forenses de determinação do período pós-morte (Wallace *et al.* 2008, Morse *et al.* 2019).



Figura 2. Adulto de *Marilia* Müller, 1880 (Odontoceridae) Foto: A. Alves.



Figura 3. Rede de captura e abrigo de *Hydropsyche* Curtis, 1835 (Hydropsychidae: Hydropsychinae) Foto: W. Graf (Morse *et al.* 2019).



Figura 4. Casa tubular portátil de *Grumichella* Müller, 1879 (Leptoceridae: Grumichellinae) Foto:F. Salles.

Família Hydropsychidae e Subfamília Macronematinae

Inserida na subordem Annulipalpia, a família Hydropsychidae é uma das mais diversas da ordem com mais de 1.900 espécies descritas, as quais estão distribuídas em todas as regiões biogeográficas, exceto a Antártica (Morse *et al.* 2019). Os integrantes da família normalmente vivem em ambientes de água corrente, já que utilizam redes de captura para filtrar seu alimento (Holzenthal & Calor 2017).

Os espécimes adultos da família Hydropsychidae não possuem ocelos, o mesoescutelo ocupa quase a metade do mesoescuto e este não possui verrugas setais. O quinto artigo do palpo maxilar é, normalmente, mais comprido que todos os outros artigos juntos (Neboiss 1991). As larvas possuem a parte dorsal dos segmentos torácicos esclerosadas, brânquias na parte ventral e ventrolateral do abdômen e do meso- e metanoto, além de um tufo de longas cerdas em cada falsa perna anal. As dimensões da malha das redes de captura variam de um gênero para o outro, potencializando ainda mais a especialização dos grupos tróficos (Wiggins 1996).

Os hidropsíquídeos estão divididos em cinco subfamílias: Arctopsychinae, Macronematinae, Hydropsychinae, Diplectroninae e Smicrideinae. Os Arctopsychinae não possuem espécies registradas no Neotrópico, enquanto Hydropsychinae e

Diplectroninae são pouco representados nessa região. Dentre essas, Macronematinae e Smicrideinae possuem a maior riqueza de gêneros e espécies na Região Neotropical, assim como muitos endemismos para essa região (Holzenthal & Calor 2017). Macronematinae atualmente possui 16 gêneros, 8 deles presentes na Região Neotropical: *Blepharopus* Kolenati, 1859, *Centromacronema* Ulmer, 1905, *Leptonema* Guérin-Méneville, 1843, *Macronema* Pictet, 1836, *Macrostemum* Kolenati, 1859, *Plectromacronema* Ulmer, 1905, *Pseudomacronema* Ulmer, 1905 e *Synoestropsis* Ulmer, 1906.

A distinção entre os gêneros dentro de Macronematinae é muitas vezes difícil, sendo ainda mais complicada a distinção entre as espécies de alguns gêneros. Isso decorre, na maioria dos casos pela homogeneidade na morfologia geral da genitália masculina, principal fonte de caracteres para delimitação taxonômica na ordem. Assim, muitas vezes espécies próximas apresentam apenas variações sutis na sua morfologia. Nesse contexto, a adição de características além da genitália masculina, como por exemplo a coloração e a venação das asas é fundamental (Ulmer 1907).

Gênero *Blepharopus* Kolenati, 1859

Blepharopus é um gênero monotípico endêmico da América do Sul, no qual se insere a espécie *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859. Essa espécie é registrada, até o momento, na Argentina, na Venezuela e no Brasil (para os estados do Acre, do Amazonas, do Pará, de Roraima, da Bahia, do Maranhão, de Pernambuco, do Piauí, do Mato Grosso, do Espírito Santo, de Minas Gerais, do Rio de Janeiro, de São Paulo, do Paraná, e de Santa Catarina) (Pes *et al.* 2021). Indivíduos de *Blepharopus diaphanus*, assim como outros Macronematinae, são geralmente encontrados em grandes rios de águas correntes (Flint & Wallace 1980).

Kolenati (1859) descreveu a espécie, fornecendo uma breve descrição, com um espécime de localidade desconhecida, mas como o coletor, Beske, vivia e trabalhava em Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brasil), supõe-se que essa seja a localidade-tipo. Ulmer (1905), alguns anos depois, fez uma redescrição de um adulto macho. Nos adultos (Fig. 5) é possível notar, principalmente nos machos, uma quilha protuberante na parte dorsal da cabeça, entre as também proeminentes verrugas setais anteriores e a cabeça e o tórax extremamente cerdosos (nos machos); nas larvas, há a presença de uma carena acima da

área dos olhos, menos desenvolvida posteriormente e o corpo é nu, exceto por algumas cerdas longas dispersas (Ulmer 1905, Flint & Wallace 1980).



Figura 5. Adulto de *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Hydropsychidae: Macronematinae) Foto: F. Salles.

Uma segunda espécie foi descrita no gênero, *Blepharopus reticulatus* Ulmer, 1905, a partir de um espécime de Santa Catarina, Brasil. O novo táxon foi definido com base em algumas diferenças: na asa anterior, manchas escuras no pterostigma e nas veias transversais da anastomose da célula discoidal para a mediana, a terceira célula apical delimitada por uma veia reta e curta e o limite superior da célula mediana mais espesso, e na asa posterior, a segunda célula apical um pouco mais larga que em *B. diaphanus* e número de esporões tibiais em machos de 1,4,4 (Ulmer 1905). Porém, Ulmer (1907) afirmou que as diferenças na venação não eram constantes e usou o nome *B. reticulatus* como variedade (var.) baseado na alteração de cor das asas. De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 1999, art. 45.6.4) o uso do termo var., em uma publicação anterior a 1961 equivale ao ranque de subespécie. Flint (1978) então afirmou que tais variações de cor poderiam ser apenas um artefato da conservação do material, de forma que os tipos de *B. diaphanus* deveriam ter apenas perdido a cor com o tempo e propôs a sinonímia entre as duas subespécies.

Blepharopus diaphanus apresenta uma ampla distribuição geográfica, abrangendo biomas e ambientes bastante distintos, tais como áreas de floresta úmida como a Amazônia e a Mata Atlântica e áreas áridas como o Cerrado e a Caatinga (Pes *et al.* 2021). De forma geral, os tricópteros, por serem insetos aquáticos e estarem associados a corpos d'água, geralmente rios e riachos, costumam apresentar uma área geográfica restrita de distribuição, especialmente na região Neotropical, onde é encontrado um elevado grau de endemismo para os tricópteros (Flint *et al.* 1999, De Moor & Ivanov 2008, Holzenthal & Calor 2017). Embora a fase adulta e reprodutiva seja terrestre, nessa fase os indivíduos não se afastam muito dos ambientes dulcícolas, onde necessitam depositar seus ovos após a cópula. Na região Neotropical, poucas espécies exibem um padrão parecido, caso de *Oxyethira tica* Holzenthal & Harris, 1992, sendo registrada do México até o sul do Brasil (Souza 2015) e *Cyrnellus fraternus* Banks, 1905 coletado desde os Estados Unidos até grande parte da América do Sul (Holzenthal & Calor 2017). Contudo, esse padrão pode ser resultado de uma dificuldade em reconhecer espécies muito similares morfológicamente, mas que possivelmente já se encontram isoladas reprodutivamente.

Técnicas moleculares em estudos taxonômicos

Estudos taxonômicos de Trichoptera, normalmente, utilizam-se da morfologia para a identificação de espécies. É observado, principalmente em diferenciação específica, a genitália masculina, mas também podem ser analisadas outras características, como a venação das asas, a coloração corporal e as verrugas setais. Visando facilitar a identificação e a delimitação de espécies, sobretudo naquelas em que somente a morfologia muitas vezes não é suficiente, a utilização de técnicas moleculares, como o marcador molecular popularizado como DNA *barcode* (fragmento do gene mitocondrial codificante da citocromo oxidase I - COI), vêm aumentando (Hebert *et al.* 2003). Esse fragmento de gene tem sido ainda utilizado para delimitação de espécies animais e estudo de espécies crípticas (Pauls *et al.* 2010).

O marcador COI é muito empregado em estudos de taxonomia molecular em animais, pois além de uma alta taxa de mutação, na maioria das vezes, a variação intraespecífica é menor e distinguível da variação interespecífica (Pauls *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2016). Grande parte dos trabalhos com taxonomia molecular em Trichoptera foi realizada com foco em outras regiões biogeográficas que não o neotrópico. Na maioria

dos estudos, espécies de Trichoptera ocorrendo em uma área muito ampla geralmente apresentam divergências genéticas altas e possivelmente sugerem ou correspondem a um complexo de espécies (p. ex. Zhou *et al.* 2007, Pauls *et al.* 2010).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a diversidade morfológica e molecular da espécie *Blepharopus diaphanus* em relação à distribuição geográfica das populações.

Objetivos específicos

- Estudar a morfologia dos indivíduos amostrados nos diferentes biomas, nas regiões hidrográficas e nas províncias biogeográficas propostas por Morrone *et al.* (2022);
- Estimar a variabilidade genética de um fragmento do gene mitocondrial COI entre as populações de *Blepharopus diaphanus* no Brasil;
- Analisar a estruturação geográfica da variação genética de COI entre os indivíduos de *B. diaphanus* das diferentes populações no Brasil;
- Revisar a taxonomia de *Blepharopus diaphanus*, de forma que os táxons definidos reflitam as variações morfológica e genética encontradas.

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Com o objetivo de popularizar o conhecimento científico produzido ao longo do projeto e disseminar a produção científica relativa a ele, foram usadas diferentes estratégias de divulgação científica. Na parte inicial do estudo, foi publicado um resumo em simpósio junto a apresentação oral deste (Marques & Santos 2020). Também foi realizado, a partir do laboratório em que a pesquisa é elaborada, a organização de dois eventos online com intuito da disseminação do conhecimento em insetos (Santos *et al.* 2021a, 2021b).

Além disso, no curso da disciplina de Divulgação Científica Aplicada a Biodiversidade foram formulados um pequeno texto, divulgado no site do Programa de

Pós-graduação (PPGBIO) (Marques 2020a) e do laboratório (LabSIN) (<https://sites.google.com/view/labsin>), e ainda um áudio, reproduzido na 72ª Reunião Anual da SBPC (Marques 2020b). Por fim, um site com mais informações sobre a dissertação foi criado, com intuito de divulgação do andamento e resultados da pesquisa (<https://sites.google.com/edu.unirio.br/blepharopus/p%C3%A1gina-inicial>).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonada N, Prat N, Resh V, Statzner B (2006) Developments in Aquatic Insect Biomonitoring: A Comparative Analysis of Recent Approaches. Annual review of entomology 51:495-523. 10.1146/annurev.ento.51.110104.151124.

Cummins KW (1973) Trophic Relations of Aquatics Insects. Annual Review of Entomology 18:183-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.18.010173.001151>.

De Moor FC, Ivanov VD (2008) Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. Hydrobiologia 595(1):393-407. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9113-2>.

Flint OS Jr (1978) Studies of Neotropical caddisflies, XXII: Hydropsychidae of the Amazon Basin (Trichoptera). Amazoniana 6, 373–421.

Flint OS Jr, Holzenthal RW, Harris SC (1999) Catalog of the Neotropical Caddisflies (Insecta: Trichoptera). Special Publication, Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, 239 pp.

Flint OS, Wallace (1980) Studies of Neotropical caddisflies, XXV: the immature stages of *Blepharopus diaphanus* and *Leptonema columbianum* (Trichoptera: Hydropsychidae). Smithsonian Contributions to Zoology 450:1–193.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWarrd JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B:Biological Sciences 270:313-321.

Hickin, NE (1967) Caddis larvae: larvae of the British Trichoptera. Hutchinson, London, 476 pp.

Holzenthal RW, Blahnik RJ, Prather AL, Kjer KM (2007) Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies. In: Zhang, Z-Q, Shear, WA (Eds) Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. *Zootaxa* 1668:639-698.

Holzenthal RW, Calor AR (2017) Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). *ZooKeys* 654:1–566.

Kjer KM, Blahnik RJ, Holzenthal RW (2001) Phylogeny of Trichoptera (caddisflies): characterization of signal and noise within multiple datasets. *Systematic Biology* 50, 781–816.

Kolenati FA (1859) *Genera et Species Trichopterorum, Pars, Altera*. *Nouveaux Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 11, 141–296.

Kristensen NP (1984) Studies on the morphology and systematics of primitive Lepidoptera (Insecta). *Steenstrupia* 10:141-191.

Lenat DR (1993) A Biotic Index for the Southeastern United States: Derivation and List of Tolerance Values, with Criteria for Assigning Water-Quality Ratings. *Journal of the North American Benthological Society* 12:279-290.

Mackay RJ, Wiggins GB (1979) Ecological diversity in Trichoptera. *The Annual Review of Entomology* 24:185–208.

Malm T, Johanson KA, Wahlberg N (2013) The evolutionary history of Trichoptera (Insecta): A case of successful adaptation to life in freshwater. *Systematic Entomology* 38: 459-473. <https://doi.org/10.1111/syen.12016>

Marques RA (2020a) Da Amazônia à Santa Catarina: extensa distribuição de uma espécie de tricóptero, um inseto aquático. In: Neves RAF (Ed.). *90 segundos no PPGBio, 2020*. Disponível em: <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/ppgbio/ppgbio-e-a-sociedade/da-amazonia-a-santa-catarina-extensa-distribuicao-de-uma-especie-de-tricoptero-um-inseto-aquatico>. Acesso em: 28 Jul 2021.

Marques RA (2020b) Da Amazônia à Santa Catarina: extensa distribuição de uma espécie de tricóptero, um inseto aquático. In: *72ª Reunião Anual da SBPC, 2020*. Disponível em: <https://ra.sbpcnet.org.br/72RA/atividades/sbpc-jovem/radios/>. Acesso em: 28 Jul 2021.

Marques RA, Santos APM (2020) Análise das Divergências Genéticas de COI em *Blepharopus diaphanus* Kolenati, 1859 (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae). In: I Simpósio Fluminense de Zoologia, 2020, Niterói. Anais do I Simpósio Fluminense de Zoologia.

Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM, Zhou X (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346(6210):763-767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>.

Morse JC (2003) Trichoptera (Caddisflies). In: Resh, VH, Carde, RT (Eds.) *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, San Diego, 1145–1151.

Morse JC, Frandsen PB, Graf W & Thomas JA (2019). Diversity and Ecosystem Services of Trichoptera. *Insects* 10(5):125. <https://doi.org/10.3390/insects10050125>.

Neboiss A (1991) Trichoptera (Caddisflies, caddises). In: CSIRO Publishing (Ed) *The Insects of Australia*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 787-816.

Pauls SU, Blahnik RJ, Zhou X, Wardell CT, Holzenthal RW (2010) DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean *Smicridea* (Smicridea) (Trichoptera:Hydropsychidae). *Journal of North American Benthological Society*, 29:1058-1074.

Pes AMO, Holzenthal RW, Sganga JV, Santos APM, Barcelos-Silva P, Camargos LM (2018) Order Trichoptera. In: Hamada N, Thorp JH, Rogers DC (Eds) Keys to Neotropical Hexapoda, Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Academic Press, Elsevier, London, 3:237-324.

Pes AMO, Santos APM (2021) Hydropsychidae In: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/13798>>. Acesso em: 29 Jul. 2021.

Riek EF (1976) The marine caddisfly family Chathamidae (Trichoptera). Journal of the Australian Entomological Society 15, 405–419.

Santos APM, Marques RA, Souza ALSA, Araujo GP, Santoro JN, Souza WRM, Paladini A, Clarkson B, Costa LNC (2021a) Café com Insetos. Evento de extensão - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO.

Santos APM, Marques RA, Souza ALSA, Araujo GP, Santoro JN, Fernandes I, Krolow, TK, Zacca T (2021b) Café com Insetos. Evento de extensão - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO.

Souza WRM (2015) Taxonomia de Hydroptilidae no Nordeste Brasileiro e Filogeografia de *Oxyethira tica* Holzenthal & Harris, 1992 (Insecta: Trichoptera). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Thomas J, Frandsen P, Prendini E, Zhou X, Holzenthal R (2020) A multigene phylogeny and timeline for Trichoptera (Insecta). Systematic Entomology 45(3): 670-686.

Trautwein M, Wiegmann B, Beutel R, Kjer K, Yeates D (2012) Advances in Insect Phylogeny at the Dawn of the Postgenomic Era. Annual review of entomology. 57, 449-68. 10.1146/annurev-ento-120710-100538.

Ueno D, Mizukawa H, Inahami O, Nagasaka H, Tatsuta N, Narazaki Y, Fujino T, Waranabe I, Kameda Y, Nakai K (2018) “Caddisfly watch,” a biomonitoring program using *Stenopsyche* larvae to determine radioactive cesium contamination in rivers following the Fukushima nuclear disaster. Landscape and Ecological Engineering 14:29-35.

Ulmer G (1905) Zur Kenntnis aussereuropäische Trichopteren. Stettiner Entomologische Zeitung 66:3-119.

Ulmer G (1907) Trichopteren. Monographie der Macronematinae. Collections Zoologiques du Baron Edm. de Selys Longchamps 6: 1–121.

Wallace JR, Merritt RW, Kimbirauskas R, Benbow ME, McIntosh M (2008) Caddisflies Assist with Homicide Case: Determining a Postmortem Submersion Interval Using Aquatic Insects. *Journal of Forensic Sciences* 53(1): 219-221.

Wheeler WC, Whiting MF, Wheeler QD & Carpenter JM (2002) The phylogeny of extant insect orders. *Cladistics* 17, 113–169.

Wiggins GB (1996) Larvae of the North American Caddisfly Genera (Trichoptera). University of Toronto Press, Toronto, Buffalo, London. xiii + 457 p.

Zhou X, Kjer KM, Morse, JC (2007) Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society* 26:719–742.

Zhou X, Frandsen PB, Holzenthal RW, Beet CR, Bennett KR, Blahnik RJ, Bonada N, Cartwright D, Chuluunbat S, Cocks GV, Collins GE, Dewaard J, Dean J, Flint OS Jr, Hausmann A, Hendrich I, Hess M, Hogg ID, Kondratieff BC, Malicky H, Milton MA, Morinière J, Morse JC, Mwangi FN, Pauls, SU, Gonzalez MR, Rinne A, Robinson JIR, Salokannel J, Shackleton M, Smith B, Stamatakis A, Sttclair R, Thomas JA, Zamora-Muñoz C, Ziesmann T, Kjer KM (2016) The Trichoptera barcode initiative: a strategy for generating a species-level Tree of Life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702):20160025. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0025>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com intuito de responder aos objetivos do presente trabalho, a diversidade morfológica e molecular de *Blepharopus diaphanus* no Brasil foi analisada em detalhe. Foi encontrada a presença um complexo de espécies crípticas, uma vez que se observou distinção molecular e separação entre as sequências nas análises, mas embora variações morfológicas tenham sido observadas, elas não foram consistentes com as linhagens detectadas. Para avaliar se populações mais próximas eram mais semelhantes entre si, foram calculadas as distâncias K2P, não sendo possível determinar um padrão. As distâncias intraespecíficas foram altas entre todas as populações e valores baixos foram observados apenas dentro desses grupos.

Não foi observada uma estruturação geográfica clara para a diversidade genética estudada, com algumas linhagens restritas a alguns locais e outras com distribuição mais ampla. Isso indica a necessidade de uma investigação mais abrangente, incluindo dados de mais populações de *Blepharopus diaphanus*, especialmente de localidades adicionais no corredor árido (Caatinga, Cerrado e Chaco).