

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Zoologia  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia

TAXONOMIA DE SYRPHIDAE (DIPTERA) DE BROMELIACEAE DA MATA  
ATLÂNTICA DO ESTADO DO PARANÁ E UTILIZAÇÃO DE DNA BARCODING  
PARA ASSOCIAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES

Projeto de dissertação apresentado como requisito para seleção do mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Proponente: Angela Maria Echeverry

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Marinoni

Janeiro de 2020

Curitiba

## 1. Introdução

Plantas da família Bromeliaceae são comuns em florestas úmidas, como na Mata Atlântica, onde se apresentam como uma das famílias de epífitas com maior riqueza de espécies. As bromélias são constituídas de raiz firme, caule pequeno e densamente coberto com folhas, formando uma roseta ou tufo; esta disposição, em muitos casos, forma um pequeno receptáculo ou tanque (Reitz 1983; Souza & Lourenzi 2008) que permitem a retenção de água e matéria orgânica nos imbricamentos das folhas, proporcionando um ambiente aquático rico em detritos que funciona como nicho a uma variedade de invertebrados, principalmente artrópodes (Benzing 1980; Frank & O'Meara 1984). Dentre as ordens de insetos encontrados em fitotelmata, os Diptera se destacam, pois várias espécies parecem dever sua alta radiação à sua associação com bromélias, incluindo várias linhagens de Syrphidae, e.g., *Ocyptamus* Macquart, *Quichuana* Knab e *Copestylum* Macquart (Guimarães & Amorim 2006).

Os representantes da família Syrphidae, também conhecidos como moscas-das-flores, compõem um grupo grande e taxonomicamente diverso de Diptera, sendo encontrados em uma ampla variedade de habitats (Weems 1953), ocorrendo tanto em ambientes urbanos quanto rurais. Atualmente, Syrphidae possui 6.000 espécies descritas para o mundo, distribuídas em 202 gêneros e três subfamílias: Eristalinae, Microdontinae e Syrphinae (Thompson *et al.* 2010). De acordo com Amorim *et al.* (2002), 82 gêneros e 1.637 espécies de Syrphidae estão registrados para a Região Neotropical. Posteriormente, Jorge *et al.* (2007) encontraram 97 espécies e 26 gêneros representando as três subfamílias de Syrphidae num inventário realizado no Parque Estadual de Vila Velha em Ponta Grossa, no Paraná.

As larvas de Syrphidae são, em geral, diversas em forma e hábitat com espécies predadoras, fitófagas e saprófagas (Wagner *et al.* 2008). A maioria das larvas da subfamília Syrphinae, por exemplo, é predadora principalmente de afídeos, e.g., *Ocyptamus gastrostactus* (Wiedemann), *Allograpta exotica* (Wiedemann), *Pseudodorus clavatus* (Fabricius) e *O. anthiphates* (Walker) (Thompson 1981; Auad & Trevizani 2005). Também, larvas de muitas espécies da família desempenham um importante papel ecológico em ambientes florestais, atuando como decompositores de matéria orgânica (Marín-Armijos *et al.* 2017). Espécies que se desenvolvem em bromélias também têm um alto potencial como indicadores de qualidade ambiental, já que os microambientes contidos em bromélias são sensíveis aos efeitos relacionados às mudanças climáticas (Marcos-García *et al.* 2012).

Rotheray *et al.* (2000) mencionam que as larvas de *Ocyptamus* Macquart desenvolvem-se e predam pequenos animais, principalmente outros artrópodes, em tanques de

bromélias. De forma mais geral, outras linhagens de sirfídeos neotropicais que apresentaram extensas radiações em associação com fitotelmatas dentro de bromélias vivas e em decomposição, incluem *Ocyrtamus* Macquart, *Quichuana* Knab e *Copestylum* Macquart.

Embora as moscas da família Syrphidae sejam relativamente abundantes, existe uma considerável falta de conhecimento da sua diversidade (Thompson 1999). A dimensão da carência de informação ficou evidente recentemente após a publicação de Rotheray *et al.* (2007), de um estudo focado nas espécies de *Copestylum* associadas a bromélias neotropicais. O estudo registrou 23 espécies, das quais 22 foram descritas como espécies novas. O cenário é ainda mais desolador quando se trata das formas imaturas de Syrphidae, já que apesar da grande riqueza de espécies registradas para a Região Neotropical, o que conhecemos sobre os seus estádios imaturos chega a ser menos do que 1% (Thompson 1999). Isso todo, apesar da crescente consciência sobre a importância dos inventários faunísticos para a priorização de áreas de conservação e monitoramento do meio ambiente, assim como a estreita relação entre o estado das populações de syrphídeos com a função e estado da estrutura de determinados ambientes (Rotheray & Gilbert 2011).

O progresso no estudo das populações de sirfídeos tem sido represado principalmente pela falta de ferramentas de identificação taxonômica tanto de adultos como dos estágios imaturos. A classificação tradicional de Syrphidae, por exemplo, baseia-se principalmente em chaves de identificação feitas com caracteres do adulto (Rotheray & Gilbert 1999). Tão pouco se conhece sobre as formas imaturas sendo esperado que não se conheçam chaves morfológicas ou outras ferramentas que permitam a correta identificação de larvas de sirfídeos, muito menos, detalhes sobre as suas etapas de desenvolvimento.

Estudos recentes sobre a diversidade e biologia de Syrphidae, têm utilizado a criação larval e apresentam esta prática como um método eficaz para a preparação de inventários que facilita também a obtenção de informações sobre os locais de reprodução e preferências de micro-habitat (Marcos-Garcia *et al.* 2012; Ricarte *et al.* 2015).

No mesmo contexto, visando superar as dificuldades associadas à identificação de espécies por características morfológicas (somado à falta de chaves para as fêmeas, imaturos e a existência de espécies crípticas), as técnicas moleculares de DNA, se apresentam como uma potente alternativa metodológica (Harvey *et al.* 2003). O uso de dados moleculares tanto na identificação de espécies, como no estudo da sua história evolutiva, tem se popularizado nos últimos vinte anos, contribuindo com o aceleração das práticas taxonômicas, como propostas de classificação mais rápidas, maior precisão (diminui a subjetividade) e descoberta de espécies crípticas (Hebert & Gregory 2005; Jordaens *et al.* 2015; Ståhls *et al.* 2009).

## 2. Justificativa

O desenvolvimento deste trabalho será relevante perante a necessidade tácita de conhecer e entender melhor a diversidade da Mata Atlântica do Estado do Paraná, que é uma área pouco estudada, apesar de ser considerada altamente biodiversa. Além disso, são necessários maiores esforços para entender sua biodiversidade, uma vez que taxas de extinção de espécies aumentaram entre cem e mil vezes as observadas durante os cinco episódios de extinção em massa que precederam o aparecimento do ser humano (Paz *et al.* 2011).

Este estudo contribuirá diretamente ao conhecimento da composição da fauna de Syrphidae associada à fitotelmata de bromélias, proporcionando uma visão mais ampla sobre a riqueza de espécies e suas interações dentro de diversos ecossistemas que compõem a Mata Atlântica. Adicionalmente, com os dados de biologia e morfologia das fases imaturas, busca-se enriquecer o banco de dados disponíveis para facilitar a identificação de espécies de sirfídeos em qualquer uma das suas fases de desenvolvimento. Junto com os dados morfológicos, será construído um amplo banco de dados de DNA com grande potencial para futuros estudos em sistemática do grupo, enriquecendo ao mesmo tempo, o leque de ferramentas taxonômicas disponíveis para a identificação das espécies de Syrphidae. Tais informações serão de extrema e fundamental importância para o estabelecimento de futuras estratégias de conservação.

Assim, levando em consideração que: a Região Neotropical é uma fonte praticamente inesgotável de conhecimento em biodiversidade que necessita maiores esforços para o melhor conhecimento; Syrphidae apresenta muitas espécies não conhecidas, pelo menos, em seu estágio imaturo; o microcosmos oferecido pelas bromélias é um campo a ser explorado para o conhecimento de novas espécies; e a necessidade de testar uma metodologia que associe adultos a formas imaturas de insetos, os objetivos do presente projeto são apresentados a seguir.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo geral

- Caracterizar a fauna de Syrphidae associada a fitotelmata de bromélias na Mata Atlântica do Estado do Paraná, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade da Região Neotropical.

### 3.2. Objetivos específicos

- Descrever os estágios de desenvolvimento (adulto, instares larvais e pupário) das espécies de Syrphidae encontradas em fitotelmata de bromélias;
- Associar estágios imaturos e adultos das espécies através de métodos filogenéticos, utilizando DNA barcoding;
- Elaborar uma chave de identificação para as espécies de Syrphidae (adultos e larvas) associadas a fitotelmata.

#### **4.1. Área de Estudo.**

As coletas serão realizadas em regiões da Mata Atlântica do Estado do Paraná, com ênfase no Parque Estadual Rio da Onça (Matinhos-PR, 25°50'S e 48°30'W) e na Floresta Estadual do Palmito (Paranaguá-PR, 25°34'S e 48°32"W).

O *Parque Estadual Rio da Onça*, foi criado pelo Decreto nº 3.825 de 04 de junho de 1981, possuindo cerca de 118,50 ha. Localiza-se na planície litorânea paranaense, praticamente ao nível do mar (2-3 m s.n.m.), a cerca de 400m da linha de maré.

A *Floresta Estadual do Palmito*, é uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável composta por 530 hectares de vegetação nativa, criada a partir do Decreto Estadual nº 4.493 de 17 de junho de 1998. Sua criação teve como objetivo promover ações que visam garantir a conservação de uma pequena parcela do ambiente Floresta Atlântica através da inserção da atividade silvicultura do Palmito-juçara (*Euterpe edulis*) e pupunha (*Bactris gasipaes*) visando, com isso, diminuir a exploração ilegal e predatória do palmito nativo que ocorre na região para garantir a sustentabilidade local desta espécie.

A escolha do Parque Estadual Rio da Onça e da Floresta Estadual do Palmito, como áreas de estudo deve-se principalmente às suas características vegetacionais e à estrutura logística adequada à pesquisa assim como segurança quanto às pressões de atividades antrópicas que pudessem comprometer os experimentos.

#### **4.2. Criação das espécies de Syrphidae.**

##### **4.2.1. Obtenção das formas imaturas.**

Os exemplares de Syrphidae serão obtidos a partir da coleta da larva nos tanques de Bromeliaceae. As plantas serão retiradas do meio, de forma aleatória, não considerando seu gênero e espécie, em todos os estratos (terrestres e epífitas). As coletas acontecerão durante o primeiro ano do projeto, principalmente nos períodos de primavera e verão. Serão realizadas coletas de no mínimo 25 exemplares, os quais serão acondicionados em sacos plásticos e

levados ao Laboratório de Estudos e Diversidade de Insetos da Região Neotropical - Taxonlab, localizado no Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Quando houver condições, algumas bromélias serão desmontadas e a triagem feita diretamente no Parque.

No laboratório, as bromélias serão desmontadas e lavadas uma a uma cuidadosamente com água destilada, sobre uma bandeja de cor branca e tamanho adequado para não deixar escapar nenhum indivíduo. As larvas de Syrphidae serão separadas de acordo com a bromélia e a data de coleta.

A metodologia utilizada para criação será a de Sepka (2008) e Morales & Marinoni (2008). As larvas de terceiro ínstar serão individualizadas, colocadas sobre folhas cortadas de Bromeliacea com aproximadamente 10 cm de comprimento, no interior de copos de vidro, preenchidos pela metade com água e pouca quantidade de detritos das bromélias. Estes copos serão então acondicionados no fundo de recipientes plásticos. Os recipientes serão cobertos com um saco plástico, no qual serão feitos pequenos furos para permitir a entrada de ar e mantidos em local sob condições ambientais de luz, calor e umidade controlados.

Os recipientes serão verificados diariamente, a fim de se encontrar os pupários. Assim que as larvas empuparem, serão retiradas do recipiente e mantidas em placas de Petri, com um pequeno pedaço de folha de bromélia, permanecendo na placa até sua emergência. Os momentos de início, empupação e emergência serão registrados.

Os imaturos que não sobreviverem à criação serão acondicionados em álcool absoluto para a extração do DNA. Os adultos que emergirem serão armazenados em álcool absoluto para extração de DNA através de métodos não destrutivos, que permitem a montagem dos espécimes em alfinete entomológico após o procedimento. Todos os vouchers serão depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure e os dados serão adicionados ao banco de dados do Projeto Taxon Line - Rede Paranaense de Coleções Biológicas.

#### **4.3. Descrição das espécies.**

A morfologia externa geral será estudada minuciosamente através de estereomicroscópio. Estudos mais detalhados da morfologia serão feitos através de Microscopia Eletrônica de Varredura, com equipamentos de uso comum disponíveis no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Os diferentes estágios (larvas, pupários e adultos) também serão fotografados com o equipamento disponível na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure - DZUP (software Automontage - Syncrosopy) e quando necessário, desenhados utilizando câmara clara acoplada ao estereomicroscópio.

Os indivíduos adultos serão identificados de acordo com bibliografia especializada (Thompson 1999) e por comparação com o material depositado na DZUP. Com os dados obtidos, as espécies de Syrphidae serão listadas e descritas, tanto como adultos, como em seus estágios imaturos, utilizando a terminologia tradicional da família (Thompson 1999; Morales & Marinoni 2008). Finalmente, com base na morfologia descrita, será construída uma chave de identificação para as espécies de sírfidos da mata atlântica paranaense.

#### **4.3. Coleta de Adultos e associação às formas imaturas.**

Serão realizadas coletas dos adultos com rede entomológica no mesmo local e período para registro das espécies de Syrphidae que ocorrem no Parque. Para a associação dos adultos às formas imaturas será empregada a metodologia de “DNA Barcoding”. Assim, parte do material coletado será acondicionada em álcool absoluto.

Os indivíduos imaturos e adultos obtidos na etapa de criação, terão seu DNA extraído usando o kit de extração INVITROGEN - PureLink Genomic DNA Mini-Kit. Após ser fotografado e descrito, o exemplar imaturo será submerso e macerado em Proteinasa K, enquanto o exemplar adulto, terá o corpo submerso na Proteinasa K (sem destruição dos tecidos), durante aproximadamente 15 horas, tempo depois do que, serão retirados, reidratados e montados em alfinete entomológico. Os seguintes passos da extração de DNA, serão iguais para adultos e imaturos, seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras de DNA serão submetidas a uma reação em cadeia da polimerasa (PCR-*Polimerase Chain Reaction*) para isolamento do fragmento Citocromo Oxidase I (*coxI*). Os fragmentos obtidos em adultos e imaturos, serão comparados por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), especializada na comparação de sequências de DNA, para determinar seu nível de convergência. Sequências de *coxI* obtidas nessa fase, serão associadas com os dados coletados na fase 4.3 “Descrição das espécies”.

#### **5. Referências bibliográficas**

- Amorim, D. D. S., Silva, V. C., & Balbi, M. I. P. A. 2002. Estado do conhecimento dos Diptera neotropicais. *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática, PRIBES*, 29-36.
- Auad, A. M. & Trevizani, R. 2005. Ocorrência de sírfideos afidófagos (Diptera, Syrphidae) em Lavras, MG. *Revista Brasileira de Entomologia* 49(3): 425-426.
- Benzing DH. 1980. *The Biology of the Bromeliads*. Eureka, California: Mad River Press.

- Frank, J.H. & O'Meara, G.F. 1984. The bromeliad *Catopsis beteroniana* traps terrestrial arthropods but harbor *Wyeomyia* larvae (Diptera Culicidae). *Florida Entomologist* 67(3): 418-424.
- Guimarães, J.H. & Amorim, D.S. 2006. Diptera. In: Costa, C.; Ide, S. & Simonka, C.E. *Insetos imaturos – Metamorfose e identificação*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 249p.
- Harvey, M. L., Dadour, I. R., & Gaudieri, S. 2003. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*, 131(2-3), 134-139.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Jordaens, K., Goergen, G., Virgilio, M., Backeljau, T., Vokaer, A., & De Meyer, M. 2015. DNA barcoding to improve the taxonomy of the Afrotropical hoverflies (Insecta: Diptera: Syrphidae). *PloS one*, 10(10).
- Jorge, C.M.; Marinoni, L. & Marinoni, R.C. 2007. Diversidade de Syrphidae (Diptera) em cinco áreas com situações florísticas distintas no parque Estadual Vila Velha em Ponta Grossa, Paraná.
- Marcos-García, M. A., García-López, A., Zumbado, M. A., & Rotheray, G. E. 2012. Sampling methods for assessing syrphid biodiversity (Diptera: Syrphidae) in tropical forests. *Environmental entomology*, 41(6), 1544-1552.
- Marín-Armijos, D., Quezada-Ríos, N., Soto-Armijos, C., & Mengual, X. 2017. Checklist of the flower flies of Ecuador (Diptera, Syrphidae). *ZooKeys*, (691), 163.
- Morales, M.N. & Marinoni, L. 2008. Immature stages and redescription of *Lejops barbiellinii* (Ceresa) (Diptera, Syrphidae) found in bromeliads in Brazil. *Zootaxa* 1830:37–46.
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. 2011. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161-175.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a malária – Bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí. 808p.
- Ricarte, A., Marcos-García, M. A., Hancock, E. G., & Rotheray, G. E. 2015. Neotropical *Copestylum* Macquart (Diptera: Syrphidae) breeding in fruits and flowers, including 7 new species. *PloS one*, 10(11).
- Rotheray, G. E., & Gilbert, F. 2011. *The natural history of hoverflies*. Forrest text.
- Rotheray, G. E.; Hancock, E. G. & Marcos-García, M. A. 2007. Neotropical *Copestylum* (Diptera, Syrphidae) breeding in bromeliads (Bromeliaceae) including 22 new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150: 267-317
- Rotheray, G. E.; Zumbado, M.; Hancock, E. G. & Thompson, F. C. 2000. Remarkable aquatic predators in the genus *Ocyptamus* (Diptera, Syrphidae). *Studia Dipterologica* 7: 385-398.
- Rotheray, G., & Gilbert, F. 1999. Phylogeny of Palaearctic Syrphidae (Diptera): evidence from larval stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 127(1), 1-112.

- Sepka, E. R. 2008. Estudo de macroinvertebrados associados a bromeliaceae em uma área de mata atlântica no estado do Paraná, Brasil, com ênfase na família Syrphidae (Diptera). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Souza & Lourenzi, 2008. Las Bromeliáceas, E. 3.3. 10.2. b. Biología floral/Fenología. 139-147.
- Stähls, G., Vujic, A., PÉREZ-BAÑON, C., Radenkovic, S., Rojo, S., & Petanidou, T. 2009. COI barcodes for identification of *Merodon* hoverflies (Diptera, Syrphidae) of Lesvos Island, Greece. *Molecular Ecology Resources*, 9(6), 1431-1438.
- Thompson F, Rotheray G, Zumbado M. 2010. Chapter 53. Syrphidae (Flower Flies), 763-765. En: Brown B.V, Borkent A, Cumming J.M, Woodley N.E. y Zumbado M.A (eds.) *Manual of Central American Diptera* (Vol.2). NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 728 pp.
- Thompson, F. C. 1999. A key to the genera of the flower flies (Diptera: Syrphidae) of the Neotropical Region including descriptions of new genera and species and a glossary of taxonomic terms used. *Contr. Ent. International* 3: 321-378.
- Thompson, F.C. 1981. The flower flies of the West Indies (Diptera: Syrphidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington* (9).
- Wagner, R.; Barták, M.; Borkent, A.; Courtney, G.; Goddeeris, B.; Haenni, J. P.; Knutson, L.; Pont, A.; Rotheray, G. E.; Rozkosný, R.; Sinclair, B.; Woodley, N.; Zatwarnicki, T. & Zwick, P. 2008. Global diversity of dipteran families (Insecta Diptera) in freshwater (excluding Simuliidae, Culicidae, Chironomidae, Tipulidae and Tabanidae). *Hydrobiologia* 595:489–519.
- Weems, H.V.J. 1953. Notes on collecting syrphid flies (Diptera: Syrphidae). *The Florida Entomologist* 36(3): 91-98.

## 6. Orçamento

### 6.1. Espaço físico.

Laboratório de Estudos e Diversidade de Insetos da Região Neotropical - Taxonlab, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

**6.2. Equipamentos (disponível).** Estereomicroscópio, Lupa Leica MZ16 acoplada a uma câmera Leica DFC 500.

### 6.3. Material de consumo

Álcool (50L)	R\$ 150,00	Pinça de relojoeiro (2)	R\$ 50,00
10 Bandejas (14x11 cm – 1L)	R\$ 30,00	Pipeta de Paster de plástico estéril (500)	R\$ 60,00
50 Copos de vidro (12 x 6 cm)	R\$ 50,00	Luvas cirúrgicas	R\$ 30,00
Água Destilada	0.0	Sacos plásticos (10L)	R\$ 50,00
Alfinete Entomológico (1.000)	R\$ 100,00	30 Placas de Petri	R\$ 300,00

PureLink Mini-Kit	Genomic DNA	R\$ 350,00	Sequenciamento GoGenetic, UFPR x 50 amostras	DNA – R\$ 2.000,00
----------------------	----------------	------------	-------------------------------------------------	-----------------------

# O material para as análises moleculares será o protocolar e todas as despesas serão arcadas pelo Laboratório de Estudos e Diversidade de Insetos da Região Neotropical - Taxonlab, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

### 7. Cronograma de atividades

Atividades	2020											2021											2022	
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Disciplinas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Coletas									X	X	X	X												
Criação do material coletado									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Identificação do material									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Microscopia eletrônica de varredura											X	X							X	X				
Descrições de espécies									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Análises moleculares																X	X	X	X	X				
Análises de associação entre imaturos e adultos																			X	X				
Confeção de chave de identificação de Syrphidae																				X	X	X		
Prefedesa																					X			
Redação do manuscrito final																					X	X	X	
Defesa																							X	

Curitiba, 31 de janeiro de 2020.

Angela Echeverry

Luciane Marinoni