

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MUTILÍDEOS NEOTROPICAIS: FILOGENIA DA SUBTRIBO PSEUDOMETHOCINA  
(HYMENOPTERA, MUTILLIDAE, SPHAEROPHTHALMINAE)

PROJETO DE DOUTORADO

DAVID RICHARD DA LUZ

Orientador: Prof. Dr. GABRIEL AUGUSTO RODRIGUES DE MELO

CURITIBA  
JULHO / 2011

## 1. INTRODUÇÃO

A família Mutillidae compreende um grupo monofilético de vespas solitárias aculeadas (Hymenoptera, Aculeata) que apresentam acentuado dimorfismo sexual e são parasitóides de imaturos de outros insetos (Brothers 1989). A família é cosmopolita, sendo que a sua maior diversidade ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Brothers 1975). Atualmente são reconhecidas cerca de 4.200 espécies (Lelej 2007) distribuídas em 208 gêneros (Lelej & Brothers 2008).

Das sete subfamílias reconhecidas (*sensu* Brothers 1975, Brothers 1999) apenas duas, Mutillinae e Sphaerophthalminae, ocorrem na região Neotropical, com aproximadamente 1.500 espécies descritas (Nonveiller 1990). A subfamília Sphaerophthalminae inclui cerca de 2.500 espécies descritas em 80 gêneros (Brothers & Finnermore 1993) e divide-se em duas tribos: Dasytabrini, restrita ao Velho Mundo, e Sphaerophthalmini, restrita ao Novo Mundo e Austrália (Brothers 1975). A tribo Sphaerophthalmini reúne a maior diversidade de mutilídeos neotropicais, com 43 gêneros e cerca de 850 espécies (Brothers 2006b) e é dividida em duas subtribos, cujos membros nem sempre são fáceis de alocar em uma ou outra: Pseudomethocina, com 22 gêneros, e Sphaerophthalmina, com 21 gêneros (Brothers 1975, Brothers 2006a, Cambra & Quintero 2007).

Tradicionalmente, a separação das duas subtribos é feita com base no formato do primeiro segmento metassomal, que em Pseudomethocina é geralmente sésil, enquanto que em Sphaerophthalmina o metassoma tende a ser peciolado (pelo menos nos machos) (Brothers 1975).

Embora seja uma divisão útil, existe um grande problema em definir os limites entre as subtribos. É possível que vários gêneros hoje alocados em Pseudomethocina não pertençam à subtribo (isto se aplica certamente ao gêneros do Velho Mundo descritos por Lelej & Krombein (1999) e Lelej (2005)) e alguns que hoje são considerados Sphaerophthalmina poderiam na verdade ser Pseudomethocina (Brothers, comunicação pessoal)). Um fator agravante a este problema é que praticamente não existem estudos filogenéticos dos gêneros de Mutillidae na região Neotropical ou em nenhuma outra região (Manley & Pitts 2002, Brothers 2006b).

O único estudo que lidou, ainda que superficialmente, com as relações entre alguns gêneros neotropicais de Mutillidae foi o trabalho de Quintero & Cambra

(2006). Os resultados encontrados sugerem que gêneros tradicionalmente alocados em Pseudomethocina apresentam maior afinidade com gêneros da subtribo Sphaerophthalmina. Apesar de o número amostral ser pouco representativo (apenas dez gêneros de Pseudomethocina e sete de Sphaerophthalmina), estes resultados indicam que a problemática envolvendo os limites das subtribos de Pseudomethocini e a relação entre os gêneros de Pseudomethocina deve ser melhor investigada.

Pseudomethocina compreende, na região Neotropical, os seguintes gêneros (Brothers 2006a): *Allotilla* Schuster, *Anomophotopsis* Schuster, *Atilium* Mickel, *Calomutilla* Mickel, *Chaetotilla* Schuster, *Darditilla* Casal, *Dimorphomutilla* Ashmead, *Euspinolia* Ashmead, *Gurisita* Casal, *Hoplocrates* Mickel, *Hoplognathoca* Suárez, *Hoplomutilla* Ashmead, *Horcomutilla* Casal, *Lynchiatilla* Casal, *Mickelia* Suárez, *Pappognatha* Mickel, *Patquiatilla* Casal, *Pertyella* Mickel, *Pseudomethoca* Ashmead, *Seabratilla* Casal, *Tallium* André e *Vianatilla* Casal. Além destes, mais quatro gêneros fazem parte da subtribo: o gênero *Myrmilloides* André, restrito à região Neártica, e três gêneros (*Cockerellidia* Lelej & Krombein, *Karlidia* Lelej e *Standfussidia* Lelej) do Velho Mundo, da região Oriental. A Tabela 1 do Anexo apresenta a lista dos gêneros neotropicais de Pseudomethocina, o seu número de espécies, sexos conhecidos e distribuição geográfica.

Já a subtribo Sphaerophthalmina compreende atualmente 40 gêneros, sendo 21 exclusivos da região Neotropical, 10 da região Neártica, três ocorrendo no Novo Mundo e seis no Velho Mundo (Brothers, 1975, Lelej 2002, 2005, Brothers 2006a, Cambra & Quintero 2007).

Segundo Brothers (1975), a família Mutillidae permanece pobremente estudada taxonomicamente, em parte, devido ao seu acentuado dimorfismo sexual. Todas as fêmeas são ápteras e a grande maioria dos machos é alada, embora umas poucas espécies apresentem machos braquípteros ou ápteros.

Este extremo dimorfismo torna a associação de sexos uma tarefa difícil e tem levado a numerosas descrições de espécies, e até mesmo gêneros, baseadas em um único sexo (p. ex. Quintero & Cambra 1994, Pitts & Parker 2003, Cambra & Quintero 2008). Observações de cópula e testes em condições de laboratório têm sido usadas para associar os sexos de Mutillidae (p. ex. Manley 1999, Garcia *et al.* 2006, Bergamaschi *et al.* 2010). Dados de hospedeiros ou, em certos casos, o uso de dados geográficos, também podem ser utilizados para associar sexos (Manley &

Pitts 2002), porém, associar sexos através deste método pode ser ainda mais complicado pelo fato de que, em certas espécies, diferentes hospedeiros são utilizados para cada sexo (Matthews 1997).

Nos últimos anos, técnicas moleculares vem sendo empregadas com grande sucesso para associar sexos de mtilídeos (Pilgrim & Pitts 2006, Pitts *et al.* 2007, Pilgrim *et al.* 2008), resultando em muitas sinonímias através da correspondência entre machos e fêmeas.

## **2. OBJETIVOS**

- Investigar as relações filogenéticas entre os gêneros neotropicais da subtribo Pseudomethocina;
- Testar a monofilia de Pseudomethocina da região Neotropical, incluindo na análise gêneros da subtribo Sphaerophthalmina e de outras regiões biogeográficas;
- Revisar a classificação e os limites da subtribo com base nos resultados filogenéticos;
- Associar machos e fêmeas através de técnicas de biologia molecular e descrever os novos sexos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Parte do material que será utilizado neste estudo está depositado na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP). Exemplos adicionais dos gêneros de Pseudomethocina e dos grupos externos serão solicitados através de empréstimos e permuta com outras instituições de pesquisa nacionais e internacionais ou serão analisados presencialmente em visitas de estudo. Coletas de material adicional serão programadas para algumas localidades do Brasil, ainda a definir.

### **3.1 ANÁLISE CLADÍSTICA**

Uma vez que *Pseudomethocina* provavelmente não forma um grupo monofilético (Pitts, comunicação pessoal), serão incluídos neste estudo representantes neotropicais, neárticos e do Velho Mundo de gêneros da subtribo *Sphaerophthalmina*, a fim de garantir uma representatividade suficiente de grupos externos para que a monofilia dos grupos neotropicais de *Pseudomethocina* seja testada.

Para testar a monofilia e reconstruir as relações filogenéticas dos gêneros neotropicais de *Pseudomethocina*, será realizada uma análise cladística baseada em dados morfológicos. Será incluído na análise o maior número de gêneros e espécies possíveis, a fim de representar a maior diversidade morfológica possível dentro dos grupos em questão.

Será construída uma matriz de caracteres morfológicos utilizando a metodologia usualmente adotada em trabalhos de sistemática, com exame minucioso dos espécimes sob microscópio estereoscópio, dissecação da genitália dos machos e de outras estruturas quando necessário. A terminologia adota será aquela comumente utilizada em Mutillidae (p.ex. Brothers 1975, Manley & Pitts 2002, Cambra & Quintero 2003).

Os caracteres serão tratados como categorias comparáveis de características e seus estados como hipóteses primárias de agrupamento (Hawkins *et al.* 1997). De acordo com Patterson (1982), o estabelecimento da identidade dos caracteres corresponde à primeira hipótese de homologia (homologia táxica). O estabelecimento das homologias primárias (de Pinna 1991) seguirá as duas etapas propostas por Brower & Schawaroch (1996), em que primeiramente delimitam-se os caracteres e posteriormente atribuem-se os estados dos mesmos. A construção dos caracteres levará em consideração a correspondência topológica entre as estruturas observadas, bem como a independência e a hierarquia dos caracteres e estados. A construção da matriz de dados e a busca heurística pelos cladogramas mais parcimoniosos será feita através do programa TNT (Goloboff *et al.* 2008). A parcimônia de Fitch (1971) será o critério de otimização utilizado no presente estudo. Este critério trata todos os caracteres como não aditivos, de modo que a mudança de um estado a outro não invoca estados intermediários.

### 3.2 ASSOCIAÇÃO SEXUAL

Algumas coletas serão realizadas com o objetivo de coletar o maior número de fêmeas e machos de uma determinada área. Os machos serão coletados através do uso de armadilhas Malaise, enquanto que as fêmeas serão coletadas por meio de busca ativa e/ou armadilhas *Pitfall*. Após as coletas, os espécimes serão devidamente rotulados, identificados e armazenados em freezer a -20°C em etanol 95% até a extração. As extrações serão realizadas no Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urban” do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Posteriormente em laboratório, será seguido o método proposto por Pilgrim & Pitts (2006) para realizar as associações sexuais, bem como o protocolo de extração do DNA total. Será sequenciada pelo menos uma fêmea de cada morfoespécie encontrada e alguns machos identificados como pertencentes ao mesmo gênero. Fragmentos dos genes nucleares ITS1 e ITS2 serão amplificados pela técnica de PCR e o sequenciamento das duas fitas, *forward* e *reverse*, será realizado através da empresa Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>), localizada em Seul, Coréia do Sul. Cada amostra terá sua sequência consenso construída através dos programas Pregap4 e Gap4, do pacote Staden Package 1.7.0 (Bonfield *et al.* 1995). As sequências obtidas serão editadas no programa BioEdit 7,0.9.0 (Hall 1999) e alinhadas através do programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), implementado no BioEdit. As distâncias interespecíficas e intraespecíficas serão calculadas através do programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

Todos os espécimes utilizados nas extrações serão devidamente montados, etiquetados e depositados como material testemunho na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP).

#### 4. CRONOGRAMA

Atividades	2011	2012		2013		2014		2015
	2º Sem.	1º Sem.						
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	
Obtenção de créditos	X	X	X					
Seminário III		X						
Seminário IV				X				
Seminário V						X		
Seminário VI							X	
Exame de qualificação			X					
Bolsa Sanduíche							X	
Coletas	X	X	X	X	X	X		
Solicitação de material	X	X	X	X	X	X		
Visitas de estudo		X	X	X	X			
Coleta de dados	X	X	X	X	X	X		
Análises cladísticas			X	X	X	X	X	
Análises moleculares				X	X	X		
Redação da Tese						X	X	X
Defesa								X

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergamaschi, A. C. B., R. Cambra & G. A. R. Melo. 2010. Male description and host record for *Lophomutilla corupa* Casal, 1968 (Hymenoptera, Mutillidae), with behavioural notes on mating behaviour and host nest attacks. **Journal of Natural History** **44**: 2597-2607.
- Bonfield, J.K., K. F. Smith & R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research** **23**: 4992-4999.
- Brothers, D. J. & A. T. Fynnmore. 1993. Mutillidae, p. 187-201. *In*: Goulet, H. & J. T. Huber (Eds.). **Hymenoptera of the world: An identification guide to families**. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa, 668p.
- Brothers, D. J. 1975. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. **The University of Kansas science bulletin** **50**: 483-648.
- Brothers, D. J. 1989. Alternative life-history styles of mutillid wasps (Insecta, Hymenoptera), p. 279-291. *In*: Bruton, M. N. **Alternative Life-History Styles of Animals**. Kluwer Academic Publishers, 624p.
- Brothers, D. J. 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zoologica Scripta** **28**: 233-249.
- Brothers, D. J. 2006a. Familia Mutillidae, p. 586-593. *In*: Hanson, P. E. & I. D. Gauld (Eds.). **Hymenoptera de la Región Neotropical**. The American Entomological Institute, 994p.
- Brothers, D. J. 2006b. Familia Mutillidae, p. 577-593. *In*: Fernández, F. & M. J. Sharkey (Eds.). **Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical**. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 894p.
- Brower, A. V. Z. & V. Schwaroch. 1996. Three steps of homology assessment. **Cladistics** **12**: 265-272.
- Cambra, R. A. & D. Quintero. 2003. Description of the previously unknown male of the Neotropical genus *Hoplognathoca* Suárez and new distribution records (Hymenoptera: Mutillidae: Sphaerophthalminae). **Transactions of the American Entomological Society** **129**: 487-495.
- Cambra, R. A. & D. Quintero. 2007. *Chilemutilla*, a new genus of Mutillidae (Hymenoptera) from Chile, and the description of the first wingless mutillid male from South America. **Transactions of the American Entomological Society** **133**: 167-180.
- Cambra, R. A. & D. Quintero. 2008. New species and new distribution records for *Pseudomethoca* Ashmead (Hymenoptera: Mutillidae) from Central America. **Transactions of the American Entomological Society** **134**: 69-86.
- de Pinna, M. C. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics** **7**: 367-394.
- Fitch, W. M. 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology** **20**: 406-416.
- Garcia, E. Q., R. Cambra & G. A. R. Melo. 2006. Sexual associations of two species of mutillid wasps (Hymenoptera, Mutillidae), with the description of a new species of *Anomophotopsis*. **Revista Brasileira de Entomologia** **50**: 379-384.
- Goloboff, P. A., J. S. Farris & K. C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics** **24**: 774-786.

- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series 41**: 95-98.
- Hawkins, J. A., C. E. Hughes & R. W. Scotland. 1997. Primary homology assessment, characters and character states. **Cladistics 13**: 275-283.
- Lelej, A. S. & D. J. Brothers. 2008. The genus-group names of Mutillidae (Hymenoptera) and their type species, with a new genus, new name, new synonymies, new combinations and lectotypifications. **Zootaxa 1889**: 1-79.
- Lelej, A. S. & K. V. Krombein. 1999. Two remarkable new genera of mutillid wasps (Hymenoptera: Mutillidae, Sphaerophthalminae, Pseudomethocini) from Thailand. **Far Eastern Entomologist 79**: 1-8.
- Lelej, A. S. 2002. **Catalogue of the Mutillidae (Hymenoptera) of the Palaearctic region**. Dalnauka, Vladivostok, 171p.
- Lelej, A. S. 2005. **Catalogue of the Mutillidae (Hymenoptera) of the Oriental Region**. Dalnauka, Vladivostok, 252p.
- Lelej, A. S. 2007. Biogeography of mutillid wasps (Hymenoptera, Mutillidae), p. 82-111. *In*: Rasnitsyn, A. P. & V. E. Gokhman (Eds.). **Studies on Hymenopterous Insects**. Collection of Scientific Papers. KMK Scientific Press Ltd., Moscow.
- Manley, D. G. & J. P. Pitts. 2002. A key to the genera and subgenera of Mutillidae (Hymenoptera) in America north of Mexico with description of a new genus. **Journal of Hymenoptera Research 11**: 72-100.
- Manley, D. G. 1999. Synonymy of *Dasymutilla nocturna* Mickel (Hymenoptera: Mutillidae). **The Pan-Pacific Entomologist 74**: 18-22.
- Matthews, R. W. 1997. Unusual sex allocation in a solitary parasitoid wasp. *Sphaerophthalma pensylvanica* (Hymenoptera: Mutillidae). **Great Lakes Entomologist 30**: 51-54.
- Nonveiller, G. 1990. **Catalogue of the Mutillidae, Myrmosidae and Bradynobaenidae of the Neotropical region including Mexico (Insecta, Hymenoptera)**. Den Haag, 150p.
- Patterson, C. 1988. Homology in classical and molecular biology. **Molecular Biology and Evolution 5**: 603-625.
- Pilgrim, E. M. & J. P. Pitts. 2006. A molecular method for associating the dimorphic sexes of velvet ants (Hymenoptera: Mutillidae). **Journal of the Kansas Entomological Society 79**: 222-230.
- Pitts, J. P. & F. D. Parker. 2003. Description of the female and larval stage of *Odontophotopsis succinea* Viereck (Hymenoptera: Mutillidae), with new synonymy and notes. **Zootaxa 137**: 1-10.
- Pitts, J. P., T. J. Boud & E. M. Pilgrim. 2007. Molecular sex associations of three species of nocturnal velvet ant (Hymenoptera: Mutillidae). **Journal of the Kansas Entomological Society 80**: 136-145.
- Quintero, D. & R. A. Cambra. 1994. Systematics of *Pseudomethoca areta* (Cameron): Sex association, description of the male and gynandromorph, and a new synonymy (Hymenoptera: Mutillidae). **Journal of Hymenoptera Research 3**: 303-308.
- Quintero, D. & R. A. Cambra. 2006. The genus *Allotilla* Schuster (Hymenoptera: Mutillidae): phylogenetic analysis of its relationships, first description of the female and new distribution records. **Journal of Hymenoptera Research 15**: 270-276.

- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**: 1596-1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.

## ANEXO

Tabela 1 – Número de espécies, sexos conhecidos e distribuição dos gêneros de *Pseudomethocina* da Região Neotropical.

Gênero	Spp.	Sexo	Distribuição
<i>Allotilla</i> Schuster	1	♂♀	Argentina
<i>Anomophotopsis</i> Schuster	1	♂♀	Argentina, Brasil
<i>Atilium</i> Mickel	52	♂♀	Brasil, Peru e Argentina
<i>Calomutilla</i> Mickel	5	♂♀	Panamá e Brasil
<i>Chaetotilla</i> Schuster	1	♂	Argentina
<i>Darditilla</i> Casal	40	♂♀	sul da América do Sul
<i>Dimorphomutilla</i> Ashmead	12	♂♀	sul do Chile e oeste da Argentina
<i>Euspinolia</i> Ashmead	14	♂♀	Peru, Chile e Argentina
<i>Gurisita</i> Casal	1	♀	Argentina
<i>Hoplocrates</i> Mickel	42	♂♀	Panamá ao norte da Argentina
<i>Hoplognathoca</i> Suárez	5	♂♀	México ao Equador
<i>Hoplomutilla</i> Ashmead	103	♂♀	Nicarágua ao norte da Argentina
<i>Horcomutilla</i> Casal	11	♂♀	Panamá à Argentina
<i>Lynchiatilla</i> Casal	9	♂♀	Brasil e Argentina
<i>Mickelia</i> Suárez	2	♀	Brasil
<i>Pappognatha</i> Mickel	13	♂♀	Honduras à Bolívia e Brasil
<i>Patquiatilla</i> Casal	2	♂♀	Argentina
<i>Pertyella</i> Mickel	15	♂♀	México ao norte da Argentina
<i>Pseudomethoca</i> Ashmead	74	♂♀	Novo Mundo
<i>Seabratilla</i> Casal	1	♀	Brasil
<i>Tallium</i> André	35	♂♀	Bolívia e Brasil à Argentina
<i>Vianatilla</i> Casal	3	♂♀	Brasil, Peru e Argentina