

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

**ASSOCIAÇÃO MOLECULAR DE LARVAS E ADULTOS DE
HYDROPSYCHIDAE (INSECTA: TRICHOPTERA:
ANNULIPALPIA) DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS
ÓRGÃOS, RIO DE JANEIRO, BRASIL**



KARINA DE ARAÚJO ESTEVÃO

AGOSTO DE 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

**ASSOCIAÇÃO MOLECULAR DE LARVAS E ADULTOS DE
HYDROPSYCHIDAE (INSECTA: TRICHOPTERA:
ANNULIPALPIA) DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS
ÓRGÃOS, RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Aluna Karina de Araújo Estevão
Orientador Allan Paulo Moreira dos Santos
Coorientador Jorge Luiz Nessimian

AGOSTO DE 2018

Ficha Catalográfica

Estevão, Karina de Araújo

Associação molecular de larvas e adultos de Hydropsychidae (Insecta: Trichoptera: Annulipalpia) do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil / Karina de Araújo Estevão : Rio de Janeiro, 2018.

Dissertação (mestrado) --- PPGBBE, Rio de Janeiro, 2018.

Orientador : Allan Paulo Moreira dos Santos

Coorientador : Jorge Luiz Nessimian

Área de concentração : Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu namorado por ser meu super companheiro e por sempre estar comigo nos bons e nos maus momentos. Nos momentos em que pensei em desistir, em que tive decisões difíceis e depressivos, ele sempre esteve ao meu lado me consolando e ajudando a superar os obstáculos, por sempre me alegrar e me incentivar a continuar. Sou muito grata por tê-lo em minha vida, por ser meu grande amigo e o mais confiável e como diz o desenho Maça e cebola, nos formamos a “Equipe perfeita”.

Agradeço aos meus familiares, meu tio Litoca, a minha tia Neusa e ao meu primo Caio por me apoiarem e estarem comigo no momento mais turbulento da minha vida. Sou grata por ter minha tia e por ser uma grande amiga, que sempre escutou meus desabafos e me deu conselhos nos momentos que precisei. Á minha vó Maria e minha tia Sônia por terem me ajudado durante minha caminhada acadêmica, por me apoiarem e por se preocuparem comigo, devido as minhas escolhas de vida.

Agradeço aos meus orientadores Allan Santos e Jorge Nessimian pelo incentivo e apoio a continuar tentando passar na prova do mestrado. Ao Allan que me ajudou bastante no inglês. Consegui passar na prova e continuei tendo total apoio dos meus queridos orientadores. Agradeço a paciência e compreensão em determinadas situações, pelos puxões de orelha nos momentos que foram necessários, correções feitas nos relatórios e na dissertação, e sugestões para fazer um bom trabalho.

Agradeço ao Allan e aos meus amigos André Luis e Andre Alves por ajudarem bastante nas expedições de coleta do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e por não me deixarem no meio da trilha no Parnaso de Petrópolis, quando torci o joelho no meio da trilha. Agradeço também por terem me carregado nas costas até que chegássemos aos inicio do Parque para irmos ao hospital.

Agradeço aos meus amigos André Luiz e Raissa por estarem comigo nas viradas de noite no laboratório. Nossas viradas sempre foram rigorosas, cada um trabalhando em seu projeto. Mas não podia faltar aquele momento de descontração da comilança, que animava e dava energia para ficar acordado.

Agradeço ao André Alves que me ajudou bastante identificando todo o material que continha os adultos de Smicridae. Agradeço também por colaborar em meu trabalho com suas fotografias tiradas durante as expedições de coleta. Agradeço por me esperar

varias vezes para ir para Campo Grande e ajudar a carregar minhas bolsas. Nunca vou para o laboratório sem uma mala ou varias bolsas hehe.

Gostaria de agradecer ao Laboratório de entomologia por total apoio e ajuda quando precisei. Em especial gostaria de agradecer algumas pessoas, ao Leandro Dumas, por ter me ajudado a identificar os adultos de Philopotamidae, isso quando o projeto abrangia os Annulipalpia e me ajudou também nas duvidas que eu tive na parte morfológica das larvas. Aproveito para agradecer a Ana Luiza que me ensinou a mexer no microscópio com câmara aclopada. Agradeço também Ana Lucia que pentelhei varias vezes durante a identificação do material.

Ao Laboratório de poliqueta gostaria de agradecer engrandecidamente por permitir a realização dos procedimentos moleculares (extração de DNA, PCR e eletroforese), fazendo uso dos equipamentos de forma compartilhada. Gostaria de agradecer também aos colegas do Labpoly que nos momentos que precisei ou tinha alguma duvida estavam sempre à disposição.

Gostaria de agradecer ao CNPq pelas bolsas e ao professor Jorge por ter me cedido durante minha graduação e mestrado. Em tempos difíceis de arrumar emprego, as bolsas que recebi foi de grande ajuda para que eu pudesse dar continuidade na minha formação acadêmica.

Por fim quero agradecer ao programa da pós graduação e a todos os professores da pós que contribuíram em minha formação trocando conhecimentos e experiencias. E com certeza algumas disciplinas foram inspiradoras e levaram a pensar em futuros projetos de pesquisa. E aproveito para agradecer em especial a professora Leila, ainda que breve me deu conselhos e me ajudou bastante a superar e quebrar barreiras.

Resumo

Tricópteros são insetos aquáticos conhecidos principalmente pelas larvas construtoras de casas portáteis ou abrigos fixos. Contudo, assim como na maioria dos insetos, a taxonomia e identificação das espécies se baseiam principalmente em características dos adultos machos. Por possuírem diferentes níveis de tolerância a alterações ambientais, as larvas de Trichoptera são muito utilizadas nos programas de biomonitoramento de qualidade de água-doce, mas na maioria dos casos a identificação limita-se ao nível de gênero. A família Hydropsychidae foi estabelecida por Curtis (1835) e é uma das maiores famílias de Trichoptera e a mais diversa entre os Annulipalpia. Apesar do grande número de espécies descritas, poucas larvas estão associadas e descritas. O método de associação de larvas e adultos por meio da comparação de sequências de DNA é mais rápido e eficaz em comparação à criação de imaturos, por exemplo. Com o objetivo de associar larvas de Hydropsychidae às respectivas espécies, foram feitas coletas de adultos e imaturos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil. Os espécimes foram usados em reações de extração, amplificação de DNA e sequenciamento do fragmento do gene mitocondrial codificante da citocromo oxidase I (COI), popularmente conhecido como DNA barcode. Além disso, foram obtidas sequências disponíveis no Genbank ou em trabalhos anteriores e incluídas neste trabalho. A partir da comparação do total de 97 sequências, foi realizada uma análise filogenética usando o método de Neighbor-Joining (NJ) utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros. Como resultado, seis espécies de Hydropsychidae tiveram associações entre adultos e larvas, sendo cinco delas associadas pela primeira vez: *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Leptonema pallidum* Gérin, 1834; *Leptonema santosi* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi*, Almeida & Flint, 2002; *Macronema aff. immaculatum*, Mosely, 1934. As larvas associadas com sucesso foram morfológicamente descritas. Dentre os caracteres morfológicos identificados, a forma da mandíbula mostrou-se bastante útil na distinção das larvas em nível específico.

Abstract

Caddisflies are a group of aquatic insects known mainly by the behavior of larvae of building portable cases or fixed shelters. However, like most of the insects, taxonomy and identification of species are primarily based on characteristics of adult males. Because of the differences among levels of tolerance to environmental changes, Trichoptera larvae are widely used in freshwater quality biomonitoring programs, but in most of the studies identification is limited at the genus level. The family Hydropsychidae was established by Curtis (1835) and is one of the largest families of Trichoptera and the most diverse within the suborder Annulipalpia. Despite the large number of species described, few larvae are associated and described. The method of associating larvae and adults by comparing DNA sequences is faster and more efficient compared to rearing immatures in laboratory, for example. In order to associate larvae of Hydropsychidae with their respective species, adults and immatures were collected in Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brazil. The specimens were used in DNA extraction, DNA amplification, and sequencing reactions to obtain a mitochondrial gene fragment encoding cytochrome oxidase I (COI), popularly known as DNA barcode. In addition, sequences available from Genbank or from previous works were obtained and included in this study. Using the comparison of a total of 97 sequences, a phylogenetic analysis was performed using the Neighbor-Joining (NJ) method using the Kimura-2-Parameters evolution model. As a result, six species of Hydropsychidae had associations between adult and larva, five of which were associated for the first time: *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Leptonema pallidum* Gérin, 1834; *Leptonema santosi* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi*, Almeida & Flint, 2002; *Macronema aff. immaculatum*, Mosely, 1934. The larvae associated successfully were morphologically described. Among the morphological characters identified, the jaw shapes appeared as very useful in distinguishing larvae at a specific level.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista das espécies e morfotipos de Hydropsychidae coletados e estudados, com sua localização, coordenadas e abundância nos pontos coletados.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no presente estudo para amplificação do fragmento do gene COI.

Tabela 3: Programa usado nas reações de PCR para amplificação de fragmento do gene COI das espécies de Hydropsychidae.

Tabela 4. Espécies com sequências do gene COI incluídas no alinhamento com respectivas informações taxonômicas e de procedência. O código de voucher se refere ao código de referência do espécime testemunho com sequência obtida em laboratório.

Lista de Figuras

Figura 1. Larvas da família Hydropsychidae e abrigos. A – larvas de *Smicridea* sp. e *Leptonema* sp. em vista lateral; B – abrigo de larva de *Macronema* (foto de K. A. Estevão, 2018); C – abrigo de larva de *Leptonema* (foto de A. A. Alves, 2017); D – larva de *Macrostemum* (foto de K. A. Estevão, 2018).

Figura 2. Adultos da família Hydropsychidae e habitat. A - *Leptonema* sp.; B- *Smicridea* sp.; C- *Centromacronema* sp. (foto de A. A. Alves, 2017); D - ambiente aquático onde os adultos são encontrados pousados sobre a vegetação e as larvas na água (foto de K. A. Estevão, 2016).

Figura 3. Relações entre as cinco subfamílias de Hydropsychidae, com base em caracteres morfológicos e moleculares combinados (modificado de Geraci *et al.*, 2005).

Figura 4. Área do Parque Nacional da Serra dos Orgãos abrangendo parte dos municípios de Teresópolis, Guapimirim, Magé e Petrópolis.

Figura 5. Armadilhas e outras formas de captura usadas para coleta de tricópteros adultos e larvas. A – malaise; B – pano branco; C – pensilvânia; D – rapiché; E – coleta manual das larvas.

Figura 6. Morfologia geral das larvas de Hydropsychidae. *Leptonema* sp.: A – larva, vista lateral; *Smicridea* sp. – B – cabeça vista dorsal; C – cabeça vista ventral; *Leptonema* sp. D – mandíbulas.

Figura 7. Morfologia geral das larvas de Hydropsychidae. *Leptonema* sp.: A – notos torácicos, vista dorsal; B – perna anterior; C – perna mediana; D – falsa perna anal, vista dorsal; E – falsa perna anal, vista ventral.

Figura 8. **A-** A larva é considerada associada se as sequências foram idênticas. **B-** A larva é considerada associada se estiver aninhada em um mesmo clado que um adulto identificado em espécie. **C-** É necessário adicionar amostras de adultos até que os critérios de associação sejam atendidos. GE = grupo-externo.

Figura 9a. Filograma de *Neighbor-joining* para 97 sequências de COI (587 bp) de *Leptonema*, *Macronema* e *Macrostemum*, estabelecidas pelo modelo Kimura 2-Parâmetros. Valores em porcentagem de suporte de *bootstrap* maiores que 50% são mostrados sobre os clados.

Figura 9. (continuação) Filograma de *Neighbor-joining* para 97 sequências de COI (587 bp) de *Smicridea*, estabelecidas pelo modelo Kimura 2-Parâmetros. Valores em porcentagem de suporte de *bootstrap* maiores que 50% são mostrados sobre os clados.

Figura 10. *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H pernas torácicas, face externa; I – brânquias, vista lateral; J – falsa perna anal, vista ventral.

Figura 11. *Leptonema pallidum* Guérin, 1834, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H - pernas torácicas, face externa; I – falsa perna anal, vista ventral.

Figura 12. Estruturas comparadas. Ilustrações A e B foram extraídas de Dumas & Nessimian, 2010. *Leptonema tridens*: A – mandíbula, vista dorsal; B – perna protorácica, vista lateral; *Leptonema santosi*: C – mandíbula, vista dorsal; D – perna protorácica, vista lateroventral.

Figura 13. *Leptonema santosi*, Dumas & Nessimian, 2010, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H – pernas torácicas, face externa; I – Falsa perna anal, vista ventral.

Figura 14. *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi* Almeida & Flint, 1974, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H – pernas torácicas, face externa; I – Falsa perna anal.

Figura 15. *Smicridea (Rhyachophylax) froehlichii* Almeida & Flint, 1974, larva. A – hábito, vista lateral; B, C – cabeça, vista dorsal; D – cabeça, vista ventral; E – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – perna protorácica; G – Falsa perna anal, vista ventral.

Figura 16. Ilustração comparativa das mandíbulas das larvas. A – *Smicridea (Smicridea)* sp. 2; B – *Smicridea (Smicridea)* sp.

Figura 17. *Smicridea (Smicridea)* sp. 2, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – falsa perna anal, vista ventral; G – I – pernas torácicas;

Figura 18. *Macronema aff. immaculatum* Mosely, 1933, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal. ; E - noto torácico, vista dorsal; I – Falsa perna anal;

Figura 19. Ilustração comparativa das larvas. Cabeça, vista dorsal. A – *Macronema pennyi* (imagem extraída de Vidovix, 2013). B – *Macronema aff. immaculatum*.

Figura 20. Imagem comparativa das Mandíbulas. *Smicridea froehlichii* – A- Presente trabalho; B – imagem extraída do trabalho Gomes (2016); *Macronema*, C – *Macronema aff. immaculatum*; D – *Macronema exophthalmum*; E- *Macronema fragile*; F- *Macronema hageni*. (imagens D - F extraídas de Vidovix (2013)).

Sumário

1. Introdução Geral.....	13
1.1. Ordem Trichoptera.....	13
1.2. Filogenia de Trichoptera.....	14
1.3. Família Hydropsychidae.....	15
1.4. Métodos de associação entre imaturos e adultos.....	19
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Material e métodos.....	21
3.1. Área de Estudo.....	21
3.2. Obtenção do material.....	21
3.3. Identificação.....	22
3.3. Descrição e ilustração.....	23
3.4. Morfologia Geral de Hydropsychidae.....	24
3.5. Extração de DNA.....	32
3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.7. Critérios para associação de larvas e adultos de Hydropsychidae.....	36
5. Resultados.....	37
5.1. Associação de larvas e adultos.....	37
5.2.1. Descrição das larvas associadas do gênero <i>Leptonema</i>	41
<i>Leptonema ferelunatum</i> Jardim, Dumas & Nessimian, 2010.....	42
<i>Leptonema pallidum</i> Guérin, 1834.....	45
<i>Leptonema santosi</i> Jardim, Dumas & Nessimian, 2010.....	48
5.2.2. Descrição das larvas associadas do gênero <i>Smicridea</i>	51
<i>Smicridea (Rhyachophylax) ralphi</i> Almeida & Flint, 1974.....	51
<i>Smicridea (Rhyachophylax) froehlichii</i>	54
<i>Smicridae (Smicridae) paranensis</i>	58
5.2.3. Larvas associadas do gênero <i>Macronema</i>	61
<i>Macronema aff. immaculatum</i> Mosely, 1933.....	61
5.3. Caracteres importantes das larvas.....	65
6. Conclusões.....	66
7. Referências.....	67
8. Anexos.....	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ordem Trichoptera

Kirby (1813) estabeleceu a ordem Trichoptera, a qual atualmente representa a sétima maior ordem de insetos (Holzenthal *et al.* 2007a) e a mais diversa dentre os grupos estritamente aquáticos (Nebbois 1991), com 49 famílias distribuídas em 616 gêneros e aproximadamente 15.500 espécies válidas (Morse 2018). Os tricópteros são insetos holometábolos com estágios de ovo, larva e pupa habitando exclusivamente o ambiente de água-doce, com exceção da família Chathamidae, os quais habitam ambiente marinho, sendo encontrados na Nova Zelândia e na Austrália (Nebbois 1991).

Os tricópteros possivelmente surgiram no Triássico e são o grupo-irmão de Lepidoptera (Morse 1997; Grimaldi & Engel 2005; Resh & Solem 1996), formando juntos a superordem Amphiesmenoptera, suportada por caracteres morfológicos, moleculares e registros fósseis (Kristensen 1984; Wheeler *et al.* 2001; Grimaldi & Engel 2005). Algumas das sinapomorfias de Amphiesmenoptera incluem as cerdas cobrindo as asas dos adultos, modificadas em escamas nos lepidópteros e a permeabilidade da parede do abrigo da pupa. Essa última em Trichoptera sendo representada por uma parede semipermeável, o que provavelmente capacitou o ancestral do grupo a invadir o ambiente aquático e fez da ordem a primeira entre os holometábolos a apresentar estágio pupal aquático (Calor 2009).

Os adultos são terrestres e são encontrados na vegetação próximos a cursos d'água, o estágio de vida larval é aquático (Holzenthal *et al.* 2007). As larvas distinguem-se pelo comportamento de construção de seus abrigos que podem ser fixos, com redes de captura de alimento, ou abrigos móveis que carregam enquanto se alimentam (Huamantínco & Nessimian 1999).

As larvas possuem cabeça distinta totalmente desenvolvida e esclerosada, com esternas presentes. As antenas são muito curtas, com exceção no grupo da família Leptoceridae em que as antenas são relativamente longas (pelo menos 4 a 5 vezes mais longas que largas) e conspícuas. As larvas possuem peças bucais bem desenvolvidas compostas por um labro, um par de mandíbulas, um par de maxilas e um lábio. Cada segmento torácico é diferenciado, especialmente na esclerose das placas dorsais (Holzenthal *et al.* 2007). O abdômen é membranoso, podendo ter brânquias, e com o

nono segmento dotado de um par de falsas pernas anais providas de ganchos (Angrisano 1998).

As larvas de Trichoptera são componentes importantes da dinâmica trófica e do fluxo de energia em lagos, rios e riachos (Resh & Rosenberg 1984). Devido à sua diversidade e por estarem entre os macroinvertebrados aquáticos sensíveis à poluição, eles representam uma ferramenta importante para estudos ecológicos, especialmente como bioindicadores da qualidade da água (Springer *et al.* 2010).

As pupas geralmente são aquáticas e semelhantes aos adultos, porém possuem estruturas exclusivas: labro com cerdas rígidas, extremo abdominal com um par de apêndices com cerdas; mandíbulas fortes, pernas com cerdas natatórias, tergitos abdominais com ganchos dorsais e geralmente possuem brânquias abdominais externas (Angrisano 1998).

Os adultos possuem asas recobertas de cerdas e algumas escamas, geralmente de coloração marrom, verde, cinza, amarelo, bege, entre outros tons escuros. O comprimento do corpo dos adultos varia entre 1,5-3,0 mm em Hydroptilidae e alguns Glossosomatidae, chegando até 30-45 mm nas famílias Hydropsychidae e Odontoceridae (Paprocki & Holzenthal 2002). Possuem palpos maxilares e labiais desenvolvidos, mas algumas espécies podem ter as peças bucais atrofiadas.

1.2. Filogenia de Trichoptera

Diversos trabalhos têm sido publicados acerca da filogenia de Trichoptera (Ross 1964; Weaver & Morse 1986; Wiggins & Wichard 1989; Ivanov 2002; Morse 1997; Kjer *et al.* 2001, 2002, 2016; Holzenthal *et al.* 2007). Tais trabalhos se basearam em diferentes fontes, tais como caracteres morfológicos, moleculares e características comportamentais dos adultos, larvas e pupas.

Os tricópteros estão divididos em três subordens: Annulipalpia, Spicipalpia e Integripalpia. Uma quarta subordem, Permotrichoptera (Eskov & Sukatcheva 1997), pouco citadas nos trabalhos recentes, é composta exclusivamente por táxons fósseis do Permiano e com posicionamento bastante controverso, às vezes considerados representantes basais de Amphiesmenoptera e de outros grupos mais distantes filogeneticamente (Morse 1997).

As larvas da subordem Annulipalpia, geralmente são encontradas em substratos rochosos, arenoso ou em bancos de folhoso. Elas utilizam a seda (produzida por todos os

membros de Amphiesmenoptera) na construção de um abrigo fixo, que possui uma rede para captura de material em suspensão da correnteza, usado em sua alimentação. Em Integripalpia, as larvas constroem casas tubulares portáteis, que podem ser feitas inteiramente de seda, ou com grãos de areia, pedaços de folhas ou gravetos incorporados. Já em Spicipalpia, as larvas apresentam hábitos diversos, podendo ser de vida livre ou construtoras de abrigos em forma de cúpula ou de bolsa.

Nos trabalhos mais recentes, por exemplo Holzenthal e colaboradores (2007), com base em caracteres morfológicos e moleculares, enquanto Annulipalpia e Integripalpia formaram grupos monofiléticos, Spicipalpia foi recuperado como parafilético em relação à Annulipalpia.

1.3 Família Hydropsychidae

A família Hydropsychidae foi estabelecida por Curtis (1835) e é uma das maiores famílias de Trichoptera e a mais diversa entre os Annulipalpia, com mais de 1.800 espécies descritas (Holzenthal *et al.* 2011). São encontrados em todos os domínios biogeográficos do mundo, sendo mais diversificada nas regiões de clima temperado e tropical (Marinoni & Almeida, 2000).

As larvas de Hydropsychidae são caracterizadas por apresentar os três notos torácicos esclerosados, podem ter brânquias no meso- e metatórax ventrais e no abdômen e possuem dois escleritos no segmento abdominal IX. Elas constroem abrigos fixos, com uma rede de seda para captura de alimento (fig. 1). Elas vivem em habitats de águas correntes e algumas espécies se fixam em rochas ao longo das margens de lagos (Wiggins, 1996).

Os adultos de Hydropsychidae (fig. 2) são caracterizados por não apresentarem ocelos, palpos maxilares com o quinto artículo fino e alongado (exceto em *Leptonema* Guérin, 1843, não muito longo, e *Synoestropsis* Ulmer, 1905, reduzido). O mesoescuto e mesoescutelo podem apresentar manchas, cerdas e/ou escamas coloridas, sem verrugas ou tubérculos. A coloração das asas é muito variável entre os gêneros, podendo ser importante para auxiliar na identificação das espécies (Pes *et al.* 2014).

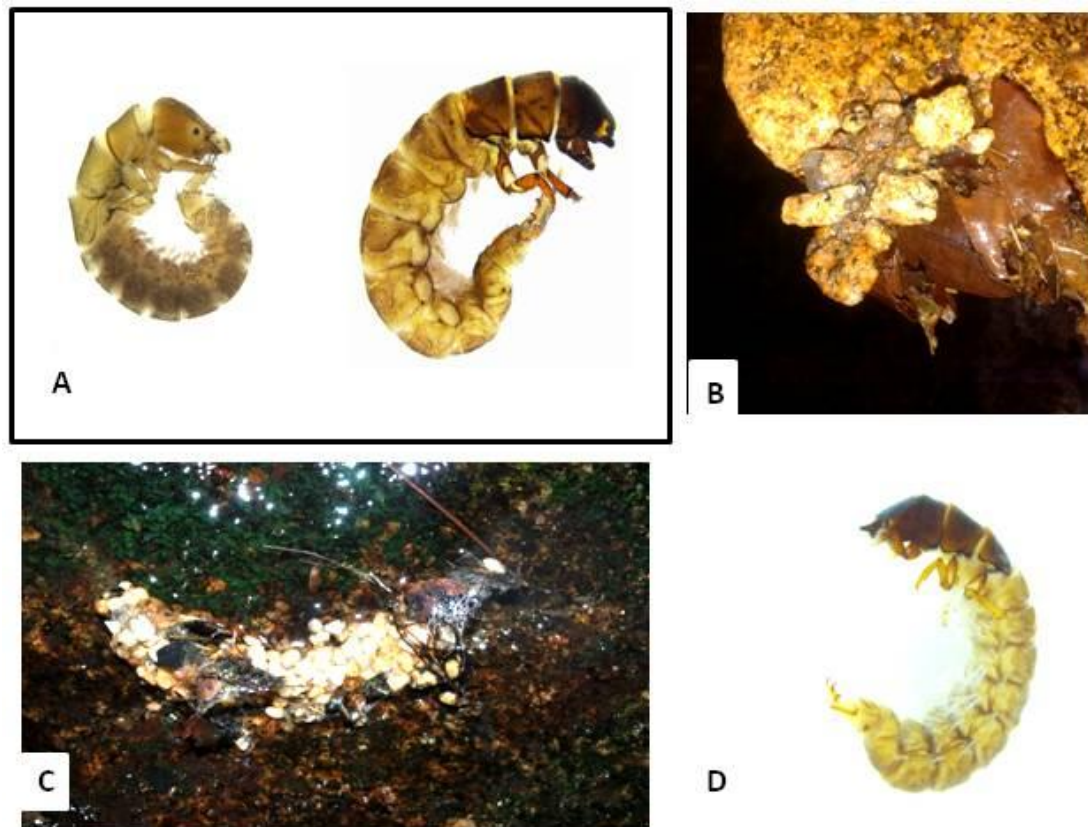


Figura 1. Larvas da família Hydropsychidae e abrigos. A – larvas de *Smicridea* sp. e *Leptonema* sp. em vista lateral; B – abrigo de larva de *Macronema* (foto de K. A. Estevão, 2018); C – abrigo de larva de *Leptonema* (foto de A. A. Alves, 2017); D – larva de *Macrostemum* (foto de K. A. Estevão, 2018).

Os Hydropsychidae são divididos em cinco subfamílias, de acordo com Scheffer (1996): Arctopsychinae, Diplectroninae, Hydropsychinae, Smicrideinae e Macronematinae. As relações filogenéticas entre as cinco subfamílias de Hydropsychidae foram estudadas por Geraci *et al.* (2005) com dados moleculares combinados com os dados morfológicos (Fig. 3).

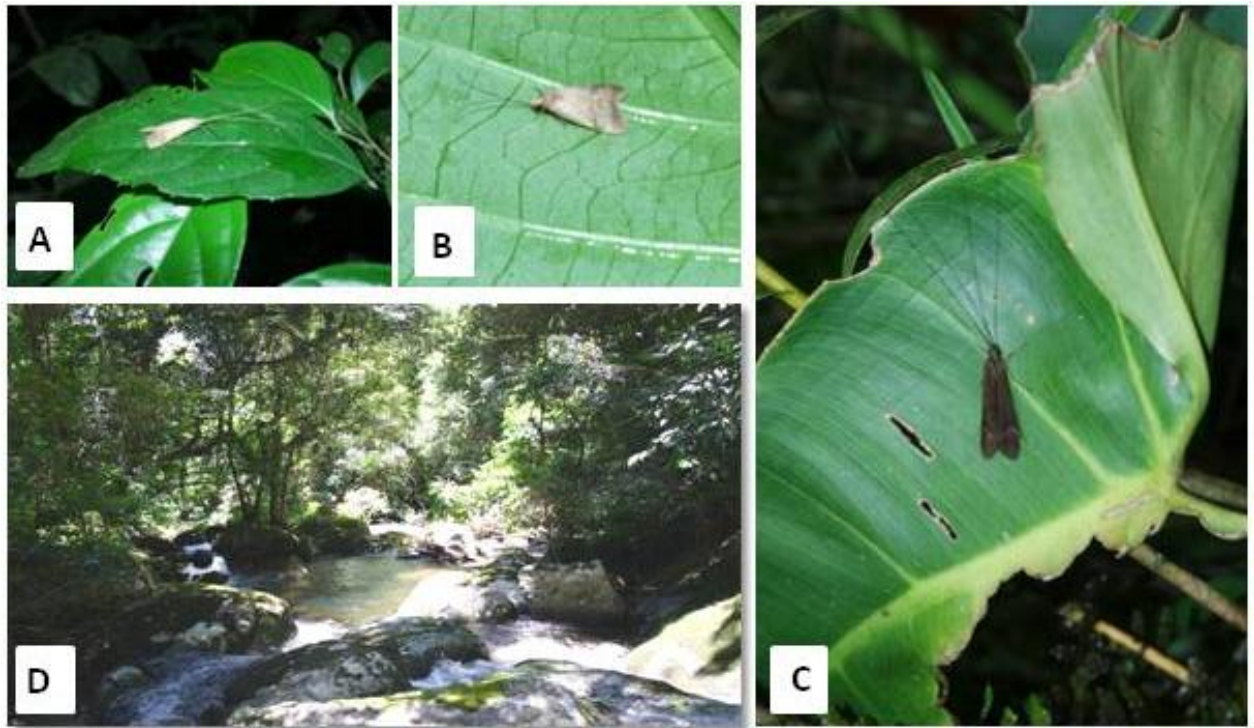


Figura 2. Adultos da família Hydropsychidae e habitat. A - *Leptonema* sp.; B- *Smicridea* sp.; C- *Centromacronema* sp. (foto de A. A. Alves, 2017); D - ambiente aquático onde os adultos são encontrados pousados sobre a vegetação e as larvas na água (foto de K. A. Estevão, 2016).

Das cinco subfamílias, apenas duas ocorrem na América do Sul: Macronematinae e Smicrideinae. A primeira é amplamente distribuída, sendo especialmente abundante e diversa nas regiões tropicais e composta por 17 gêneros, que se dividem em duas tribos: Polymorphanisini, com apenas três gêneros, e Macronematini, com 14 gêneros (Geraci *et al.* 2010). Já Smicrideinae foi a última subfamília a ser estabelecida, tendo sido proposta por Scheffer (1996) para incluir três gêneros até então posicionados em Hydropsychinae: *Asmicridea* Mosely, *Smicrophylax* Neboiss – ambos restritos à Região Australiana – e *Smicridea* McLachlan, com mais de 110 espécies de distribuição Neotropical.

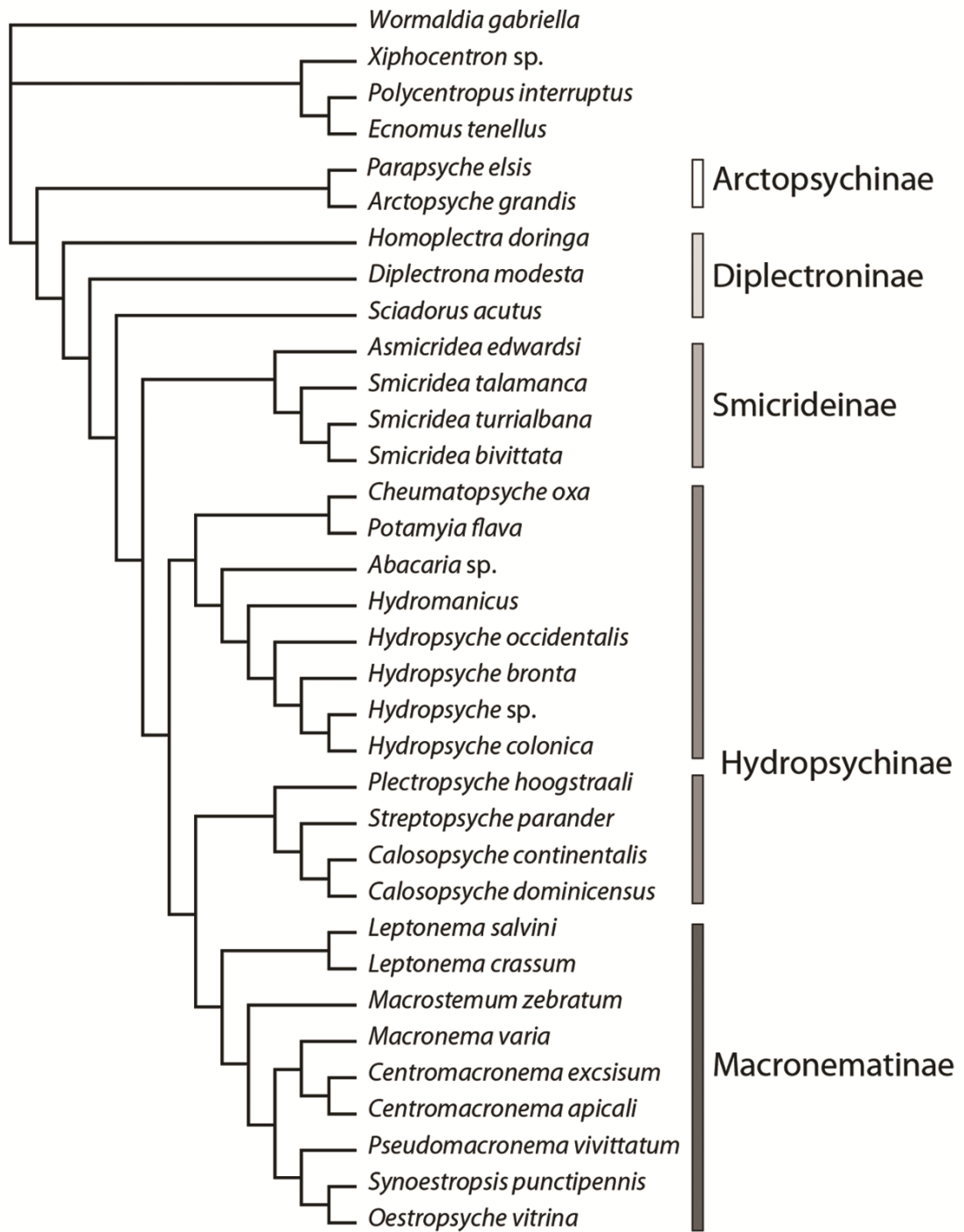


Figura 3. Relações entre as cinco subfamílias de Hydropsychidae, com base em caracteres morfológicos e moleculares combinados (modificado de Geraci *et al.* 2005).

1.4. Métodos de associação entre imaturos e adultos

A taxonomia de Trichoptera é, de forma geral, baseada no adulto macho, a identificação dos imaturos em nível de espécie depende da associação desses estágios aos adultos corretamente identificados. Por outro lado, a identificação de larvas de Trichoptera em nível específico gera dados mais acurados em trabalhos de ecologia ou naqueles em que os tricópteros são usados como bioindicadores. Nesse sentido, o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento taxonômico dos imaturos, com especial atenção à região que inclui o Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

Tradicionalmente, a associação entre larvas e adultos de Trichoptera é baseada no método do metamorfótipo, isto é, no estudo da exúvia de larva e seus escleritos após a emergência do adulto (Wiggins 1996). Esse método pode ser feito por meio da criação das larvas, ou seja, recriando artificialmente um ambiente em laboratório, usando um aquário com auxílio de uma bomba de ar. Isso proporciona dados mais refinados e importantes das larvas, como o comportamento e o tempo de duração de cada instar (Vidovix 2013). Pode ser feito também por meio da coleta de adultos farados, ou seja, adultos formados, mas ainda dentro do exoesqueleto da pupa, uma tarefa difícil, que muitas vezes depende da sorte de se encontrar um indivíduo nesse estágio. Em ambos os casos, a descrição é indireta, feita com base nos outros espécimes que apresentam as mesmas características morfológicas encontradas na exúvia e seus escleritos.

Um método mais recente e cada vez mais comum, é a comparação de sequências de DNA entre adultos identificados em espécie e imaturos. No presente trabalho a associação das larvas aos adultos, foi usado essa metodologia molecular como uma ferramenta rápida e eficaz, por meio da comparação das sequências do gene da citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial, popularmente conhecido como *DNA barcode*. Diversos trabalhos de filogenia em insetos têm sido publicados usando esse marcador, incluindo estudos sobre a ordem Trichoptera (Kjer *et al.* 2001; Kjer *et al.* 2002). Vários trabalhos também foram publicados usando esse gene para obter associações e/ou delimitação de espécies da ordem Trichoptera (p. ex.: Geraci *et al.* 2011; Ruitter *et al.* 2013; Santos *et al.* 2016).

2. Objetivos

Objetivo Geral

- Contribuir para o conhecimento da taxonomia e morfologia das larvas de Hydropsychidae neotropicais.

Objetivos específicos

- Associar larvas a adultos da família Hydropsychidae (Insecta: Trichoptera) ocorrentes no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), Rio de Janeiro, Brasil, usando sequências do gene mitocondrial codificante da citocromo oxidase I (COI);
- Descrever as larvas de Hydropsychidae que forem associadas, a partir da comparação do marcador molecular a adultos identificados em nível específico;
- Criar uma base de dados com sequências de DNA das espécies de Hydropsychidae do PARNASO que facilite identificações futuras de imaturos dessa família coletados no Parque;

3. Material e métodos

3.1. Área de Estudo

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), área de estudo do presente trabalho, é composto por uma extensa área de 20 mil hectares que abrange quatro municípios com três sedes principais: Teresópolis, Petrópolis e Guapimirim (Fig. 4). A área do parque estende-se desde 200 metros até 2.263 metros de altitude, sendo que as cotas mais elevadas predominam na parte central do parque, a área mais alta de toda a Serra do Mar. O Parque Nacional da Serra dos Órgãos protege uma das mais importantes áreas da Mata Atlântica, um dos cinco *hotspots* de biodiversidade mais ameaçados do planeta (Myers, 2000). Este bioma é impactado pela presença do homem desde o início da colonização do Brasil pelos europeus ou até antes disso (Dean, 1996). O parque protege duas importantes bacias hidrográficas fluminenses, a do Rio Paraíba do Sul e a da Baía de Guanabara, as quais são importantes no abastecimento de água das cidades vizinhas ao parque, preservando seu ecossistema natural.

Sua vegetação, bem conservada, pode ser classificada como floresta ombrófila densa (Veloso *et al.* 1991) ou floresta tropical pluvial atlântica (Rizzini, 1979) e é rica em palmeiras, cipós, epífitas e árvores de elevado tamanho. O clima é superúmido, com pouco ou nenhum déficit hídrico, com calor bem distribuído o ano todo (FIDERJ 1978). Devido à variedade de ambientes e à preservação dos mesmos, os córregos, riachos e rios do parque constituem um ambiente propício para ocorrência de uma alta diversidade de insetos aquáticos, sendo assim uma excelente área de estudo.

3.2. Obtenção do material

Foram realizadas quatro campanhas para coletas no Parque Nacional Serra dos Órgãos, nas sedes Teresópolis Guapimirim e Petrópolis nos períodos de janeiro a maio de 2016 e janeiro de 2017, totalizando 22 pontos de coleta. Para coletar os adultos foram usadas armadilhas luminosas do tipo Pensilvânia e de pano branco e armadilha de interceptação de voo do tipo malaise (Fig. 6). Os adultos foram coletados diretamente em álcool etílico 96% ou em frascos morteiros com acetato de etila para conservação dos espécimes secos e alfinetados. As larvas foram coletadas manualmente (Fig. 6) com auxílio de rede entomológica aquática (rapiché) em três substratos dos rios e riachos: pedra, folhiço retido em trechos de correnteza e raízes. Para isso, uma amostra do

substrato foi coletada com o rapiché, sendo o material triado em campo para a retirada das larvas encontradas. Os exemplares imaturos foram fixados em álcool etílico 96% para melhor preservação do material genético. Todo o material examinado encontra-se depositado na Coleção Entomológica Professor José Alfredo Pinheiro Dutra, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (DZRJ).



Figura 4. Área do Parque Nacional da Serra dos Orgãos abrangendo parte dos municípios de Teresópolis, Guapimirim, Magé e Petrópolis.

3.3. Identificação

Foram estudados 293 indivíduos adultos e 272 larvas (Tabela 1). Os adultos machos foram identificados em nível de espécie com base nos trabalhos contendo as descrições originais. Para a identificação dos adultos em espécie foram utilizados machos dos quais foi destacado o abdômen e clarificado em ácido láctico, durante pelo menos 15 minutos em banho-maria, ajudando também na expansão de partes membranosas da genitália. As larvas foram inicialmente identificadas em gênero com o auxílio de chaves de identificação (Angrisano, 1995; Pes *et al.* 2014) e então morfotipadas com base em características morfológicas como aquelas descritas por

Wiggins (1996) e Pes e colaboradores (2005). Onze morfótipos de larvas foram identificados e onze espécies com base nos adultos, representando os gêneros: *Centromacronema* Ulmer, 1905, *Leptonema* Guérin, 1843, *Macronema* Pictet, 1836, *Macrostemum* Kolenati, 1859 e *Smicridea* McLachlan, 1871.



Figura 5. Armadilhas e outras formas de captura usadas para coleta de tricópteros adultos e larvas. A – malaise; B – pano branco; C – pensilvânia; D – rapiché; E – coleta manual das larvas.

3.4. Descrição e ilustração

As larvas que foram associadas com sucesso a adultos identificados em nível específico foram descritas morfológicamente em detalhe. Além das descrições, são fornecidas fotografias do aspecto geral da larva e de estruturas morfológicas essenciais para a identificação específica. As fotografias foram obtidas sob estereomicroscópio Leica M205C, com câmera fotográfica acoplada. Cada fotografia é resultado de uma combinação de fotografias em diferentes níveis de foco obtidas com auxílio de programa de montagem LAS V4.6.

3.5. Morfologia Geral de Hydropsychidae

As larvas de Hydropsychidae em geral apresentam na cabeça coloração e padrões de manchas variando do marrom escuro para o amarelo, marcas de inserções musculares podem ser encontradas e cerdas curtas. Em sua vista **dorsal** são encontradas as seguintes estruturas: Carena dorsal ausente em hydropsychidae, com excessão de *Macrostemum* que está presente; Labro semicircular, com escovas de cerdas pectinadas, de coloração variando do marrom claro ou escuro; Sutura frontoclipeal em forma de V, com margem retilínea, côncava ou convexa, crenulada ou não, com projeções arredondadas; Sutura coronal em linha reta vertical; Mandíbulas irregulares, na mandíbula direita e esquerda com dente apicodorsal, dentes apicais e dente molar, na mandíbula direita com escova de cerdas e na mandíbula esquerda pode ter uma escova de cerdas curtas entre o dente apicodorsal e o 1 dente apical; escleritos gular ventral dividido. Na região ventral apresentam uma placa esclerosada chamada de submento, co formato trapezoide esclerito gular anterior, triangular e esclerito posterior muita das vezes triangular ou em forma de losango, diminuto; Gena com sulcos estridulatórios na maioria transversais, distintos, bem marcados ou levemente marcados, finos ou grossos, da região anterior à posterior da gena ou até a região mediana; Com ou sem inserções musculares,.

Torax. Dorsal. Apresenta notos torácicos esclerosados; pro, meso e metanoto cobertos por cerdas curtas e finas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal, meso e metanoto inteiros, podem apresentar inserções musculares; **Ventral.** Brânquias no prosterno geralmente ausentes, mesosterno e metasterno com 1 par de brânquias. **Lateral.** Pernas torácicas com variação de coloração do marrom escuras ao amarelo claro, similares no tamanho; perna anterior é mais curta que as pernas medianas e posteriores; podem conter fileira de cerdas, curtas ou longas e finas ou grossas na região dorsal e ventral da coxa e do fêmur; tarso com distinta cerda escura, longa e grossa na região apicodorsal; trocântim não forquilhado, cônico ou triangular pontiagudo. **Abdômen.** Composto de X segmentos, coberto por cerdas curtas e podem ser em forma de escamas, no caso de *Smicridea*; **Ventral.** Apresenta brânquias ventrais na maioria dos gêneros, mas podem apresentar brânquias ventrolaterais ou até mesmo brânquias laterais e quanto ao número e disposição pode variar em cada gênero. Em sua maioria apresentam 2 pares nos segmentos I-VI; brânquias ventrolaterais com 1 par nos

segmentos IV e VIII; Esterno VIII podem apresentar um ou dois escleritos subtriangulares ou até mesmo nenhum, com cerdas curtas. Esterno IX com dois escleritos subtriangulares mais longos ou curtos que a largura de sua margem posterior, com cerdas curtas, escleritos laterais podem estar presentes ou ausentes, pequeno e pouco esclerosado. Segmento X com papilas anais dorsais membranosas, que podem estar retraídas. Par de falsas pernas anais com garra simples e tufo de muitas cerdas longas ou curtas dorsais.

As principais estruturas utilizadas para descrições das larvas que foram associadas são apresentadas nas Figuras 9 e 10.

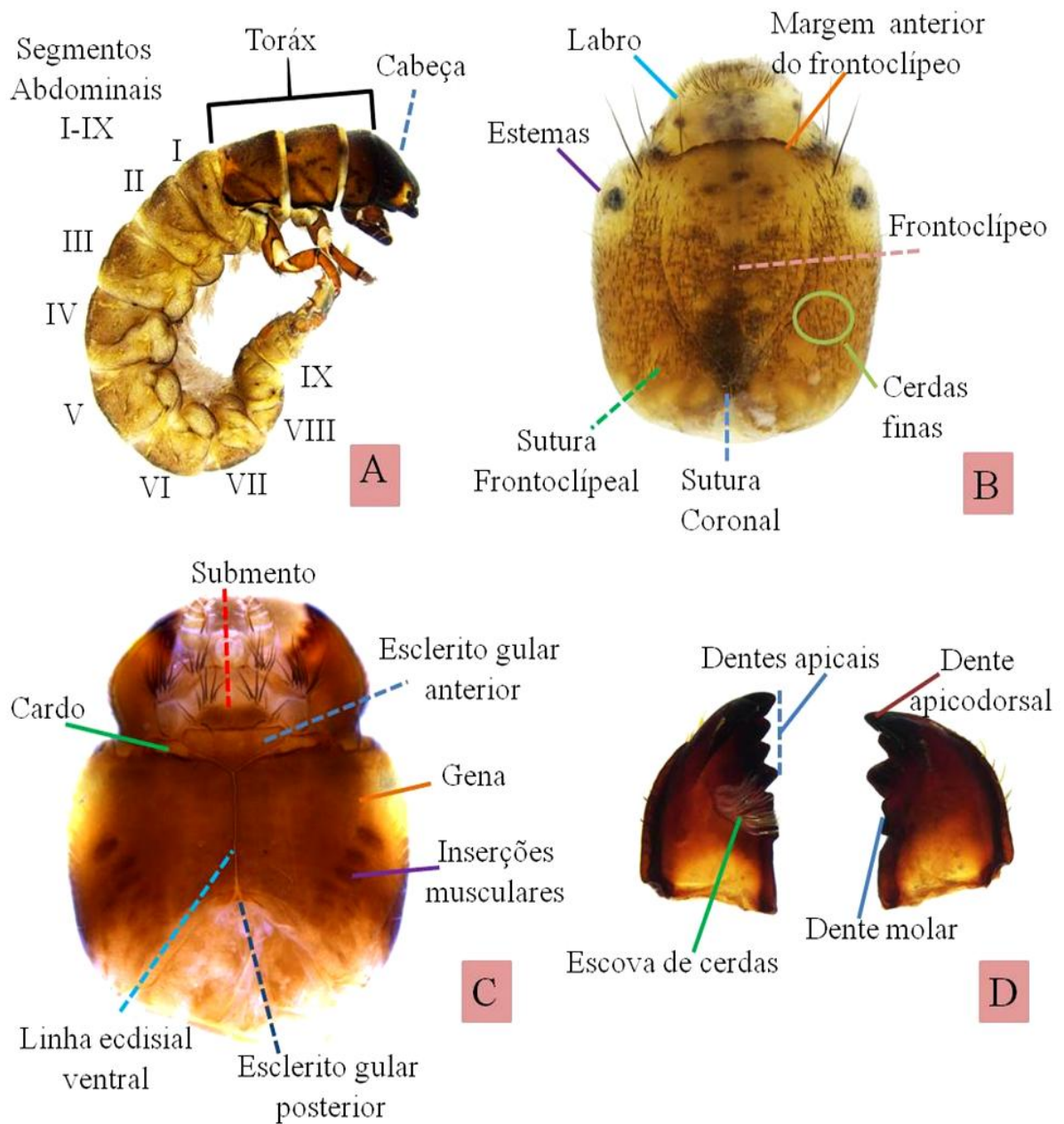


Figura 6. Morfologia geral das larvas de Hydropsychidae. *Leptonema* sp.: A – larva, vista lateral; *Smicridea* sp. – B – cabeça vista dorsal; C – cabeça vista ventral; *Leptonema* sp. D – mandíbulas.

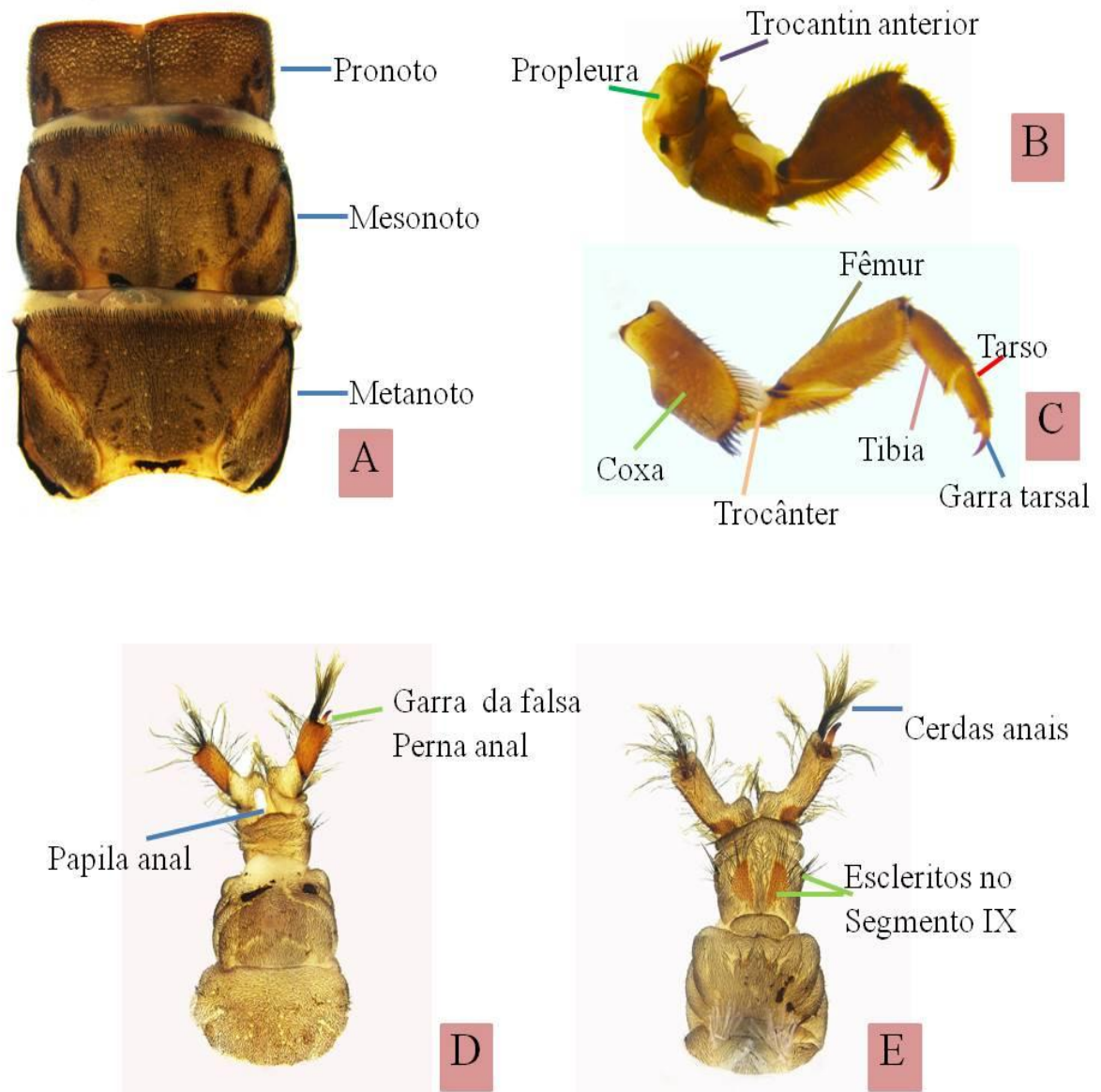


Figura 7. Morfologia geral das larvas de Hydropsychidae. *Leptonema* sp.: A – notos torácicos, vista dorsal; B – perna anterior; C – perna mediana; D – Extremidade posterior do abdome e falsas pernas anais, vista dorsal; E – Extremidade posterior do abdome e falsas pernas anais, vista ventral.

Tabela 1. Lista das espécies e morfótipos de Hydropsychidae coletados e estudados, com sua localização, coordenadas e abundância nos pontos coletados.

Ponto	Espécie/ Morfótipo	Estagio de Vida	Localização, Brazil, Rio de Janeiro	Coordenadas	Nº de indivíduos
GUAPI 01	<i>Macronema</i> sp.	Larva	Guapimirim, Represa final do parque	S22°29'45,5" W42°59'49,7" 347m	2
GUAPI 01	<i>Smicridae</i> sp. 3	Larva	Guapimirim, Represa final do parque	S22°29'45,5" W42°59'49,7" 347m	1
GUAPI 01	<i>Smicridae</i> sp.4	Larva	Guapimirim, Represa final do parque	S22°29'45,5" W42°59'49,7" 347m	1
GUAPI 01	<i>Smicridea</i> sp.	Larva	Guapimirim, Represa final do parque	S22°29'45,5" W42°59'49,7" 347m	1
GUAPI 02	<i>Leptonema</i> sp.	Adulto	Guapimirim, Afl Rio Soberbo, Ruínas	S22°29'43,5" W42°59'51,1" 365m	2
GUAPI 02	<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Afl Rio Soberbo, Ruínas	S22°29'43,5" W42°59'51,1" 365m	3
GUAPI 02	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Guapimirim, Afl Rio Soberbo, Ruínas	S22°29'43,5" W42°59'51,1" 365m	1
GUAPI 02	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Guapimirim, Afl Rio Soberbo, Ruínas	S22°29'43,5" W42°59'51,1" 365m	5
GUAPI 02	<i>Smicridae (Rhyachophylax) froehlichii</i>	Adulto	Guapimirim, Afl Rio Soberbo, Ruínas	S22°29'43,5" W42°59'51,1" 365m	1
GUAPI 03	<i>Leptonema</i> sp.	Adulto	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	1
GUAPI 03	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	24
GUAPI 03	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	2
GUAPI 03	<i>Smicridae</i> sp. 3	Larva	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	7
GUAPI 03	<i>Smicridae</i> sp.4	Larva	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	1
GUAPI 03	<i>Smicridae</i> sp. 5	Larva	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	1
GUAPI 03	<i>Smicridae (Rhyachophylax) froehlichii</i>	Adulto	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	7
GUAPI 03	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Guapimirim, Rio Soberbo, prox. Capela	S22°29'38,9" W42°59'49,5" 367m	1
GUAPI 04	<i>Leptonema</i> sp. 3	Larva	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 04	<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 04	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	3
GUAPI 04	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 04	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	11

GUAPI 04	<i>Smicridae (Rhyachophylax) froehlichii</i>	Adulto	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 04	<i>Smicridae (Smicridae) albosignata</i>	Adulto	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	7
GUAPI 04	<i>Smicridae (Rhyachophylax) jundiaí</i>	Adulto	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 04	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	10
GUAPI 04	<i>Macrostemum digramma</i>	Adulto	Guapimirim, Afl. Rio Soberbo, estrada	S22°29'39,7" W42°59'58,9" 370m	1
GUAPI 05	<i>Centromacronema</i> sp.	Adulto	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	1
GUAPI 05	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	7
GUAPI 05	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	16
GUAPI 05	<i>Smicridae</i> sp. 3	Larva	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	15
GUAPI 05	<i>Smicridae</i> sp. 3	Larva	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	5
GUAPI 05	<i>Smicridae</i> sp. 5	Larva	Guapimirim, Poço a preguiça	S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m	1
GUAPI 06	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Guapimirim, Ponto acima a capela	S22°29'37,3" W42°59'54,4" 364m	1
GUAPI 06	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Guapimirim, Ponto acima a capela	S22°29'37,3" W42°59'54,4" 364m	8
GUAPI 06	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Guapimirim, Ponto acima a capela	S22°29'37,3" W42°59'54,4" 364m	13
ML 01	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer 2ª ordem	S22°27'26,2" W43°01'24"	10
ML 01	<i>Macrostemum brasilienses</i>	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer 2ª ordem	S22°27'26,2" W43°01'24"	1
PETRO 01	<i>Smicridae (Rhyachophylax) froehlichii</i>	Adulto	Petrópolis, Pousada Vila Açú	S22°27'43" W43°05'44" 1007m	5
PETRO 01	<i>Smicridae (Smicridae) palifera</i>	Adulto	Petrópolis, Pousada Vila Açú	S22°27'43" W43°05'44" 1007m	1
PETRO 01	<i>Smicridae (Smicridae) albosignata</i>	Adulto	Petrópolis, Pousada Vila Açú	S22°27'43" W43°05'44" 1007m	25
PETRO 01	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Petrópolis, Pousada Vila Açú	S22°27'43" W43°05'44" 1007m	17
PETRO 01	<i>Macronema aff. immaculatum</i>	Adulto	Petrópolis, Pousada Vila Açú	S22°27'43" W43°05'44" 1007m	1
PETRO 04	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Petrópolis, afl. Rio Bonfim, acima ponto 3	S22°28'21" W43°05'06" 1166m	4
TELIS 02	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60" W42°59'4,90" 950m	4
TELIS 02	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60" W42°59'4,90" 950m	9
TELIS 02	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60" W42°59'4,90" 950m	7
TELIS 02	<i>Smicridae (Smicridae) palifera</i>	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60" W42°59'4,90" 950m	1

TELIS 02	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60"W42°59'4,90" 950m	23
TELIS 03	<i>Smicridae (Smicridae) palifera</i>	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60"W42°59'4,90" 950m	23
TELIS 03	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, Cach. do Coreto	S22°26'52,60"W42°59'4,90" 950m	10
TELIS 04	<i>Centromacronema</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	5
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	2
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	7
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	3
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	8
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	1
TELIS 04	<i>Leptonema</i> sp. 3	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	4
TELIS 04	<i>Macronema aff. immaculatum</i>	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	2
TELIS 04	<i>Macronema</i> sp.	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	4
TELIS 04	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	2
TELIS 04	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	8
TELIS 04	<i>Smicridae (Smicridae) albosignata</i>	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	11
TELIS 04	<i>Smicridae</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	29
TELIS 04	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Rio Paquequer, ponte	S22°27'22,80"W42°39'48,60" 1135m	2
TELIS 05	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	2
TELIS 05	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	1
TELIS 05	<i>Macronema aff. immaculatum</i>	Adulto	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	6
TELIS 05	<i>Macronema aff. partitum</i>	Adulto	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	7
TELIS 05	<i>Macronema</i> sp.	Larva	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	2
TELIS 05	<i>Macrostemum brasilienses</i>	Adulto	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	1
TELIS 05	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	1
TELIS 05	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Afl. Rio Paquequer, estrada	S22°27'18,76"W42°59'56,90" 1142m	12
TELIS 06	<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Rio Paquequer 2ª ordem	S22°27'25,90" W43°1'24,1" 2049m	1

TELIS 07	<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Cach. do Papel	S22°27'8,50" W43°0'54,80" 1682m	1
TELIS 07	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Cach. do Papel	S22°27'8,50" W43°0'54,80" 1682m	7
TELIS 07	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Cach. do Papel	S22°27'8,50" W43°0'54,80" 1682m	1
TELIS 08	<i>Macronema</i> sp.	Larva	Teresópois Cach. Véu da Noiva, trilha do Sino	S22°26'54,40" W43°0'48,3" 1583m	2
TELIS 08	<i>Macronema</i> sp.	Larva	Teresópois Cach. Véu da Noiva, trilha do Sino	S22°26'54,40" W43°0'48,3" 1583m	9
TELIS 08	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Teresópois Cach. Véu da Noiva, trilha do Sino	S22°26'54,40" W43°0'48,3" 1583m	5
TELIS 08	<i>Smicridae</i> sp. 6	Larva	Teresópois Cach. Véu da Noiva, trilha do Sino	S22°26'54,40" W43°0'48,3" 1583m	3
TELIS 09	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Ponte na trilha do Sino	S22°26'53,8 W43°0'27,4" 1332m	2
TELIS 09	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Ponte na trilha do Sino	S22°26'53,8 W43°0'27,4" 1332m	1
TELIS 09	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Ponte na trilha do Sino	S22°26'53,8 W43°0'27,4" 1332m	1
TELIS 09	<i>Smicridae (Smicridae) albosignata</i>	Adulto	Teresópolis, Ponte na trilha do Sino	S22°26'53,8 W43°0'27,4" 1332m	4
TELIS 09	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Ponte na trilha do Sino	S22°26'53,8 W43°0'27,4" 1332m	5
TELIS 10	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	1
TELIS 10	<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	1
TELIS 10	<i>Leptonema</i> sp. 3	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	6
TELIS 10	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	1
TELIS 10	<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	1
TELIS 10	<i>Smicridae</i> sp. 1	Larva	Teresópolis, Rio Beija flor acima da represa	S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m	6
TELIS 11	<i>Smicridae (Smicridae) palifera</i>	Adulto	Teresópolis, Alojamento do Parque	S22°26'57,6 W42°59'8,7" 937m	7
TELIS 11	<i>Smicridae (Smicridae) albosignata</i>	Adulto	Teresópolis, Alojamento do Parque	S22°26'57,6 W42°59'8,7" 937m	3
TELIS 11	<i>Smicridea</i> sp.	Adulto	Teresópolis, Alojamento do Parque	S22°26'57,6 W42°59'8,7" 937m	15

3.6. Extração de DNA

Para a obtenção das sequências do DNA mitocondrial do gene COI, foi utilizada uma perna do indivíduo, sem maceração, usando o kit de extração DNeasy tissue kit (Qiagen) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O restante do corpo, juntamente com o restante da perna usada na reação de extração, foi depositado em coleção entomológica como testemunho. Cinco indivíduos de cada morfótipo de larva e cinco exemplares adultos de cada espécie, quando possível, foram selecionados para as reações de extração de DNA. No total, foram realizadas 86 reações de extração.

3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas reações de PCR, foram utilizados os primers LCO-1490 e HCO-2198 (Folmer et al. 1994) e C1-J-1718 (Simon et al. 1994) (Tabela 2), para amplificação do fragmento do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) das espécies de Hydropsychidae.

Cada reação foi realizada em 25 µL totais, incluindo 13 µL de H₂O, 5 µL de Green Buffer, 3,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL de solução de dNTP a 10 µmol/mL, 0,1 µL de taq DNA Polimerase e 1 µL de DNA modelo. As reações foram então colocadas em termociclador *Applied Biosystems*® seguindo o programa apresentado na Tabela 3.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no presente estudo para amplificação do fragmento do gene COI

Código	Sentido	Primers	Referência
LCO 1490	direto	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer et al. 1994
HCO 2198	reverso	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer et al. 1994
C1-J-1718	direto	5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3'	Simon et al. 1994

Para avaliar o sucesso e a qualidade do material amplificado, os produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, o qual foi corado com GelRed™. O gel foi então observado e fotografado em transiluminador com luz ultravioleta (UV). Em caso positivo de amplificação, o produto de PCR foi enviado para purificação e sequenciamento pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, Coreia do Sul).

Tabela 3: Programa usado nas reações de PCR para amplificação de fragmento do gene COI das espécies de Hydropsychidae.

Programa 1			
Nº de ciclos	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
5	Desnaturação	95°C	30 segundos
	Anelamento	45°C	1,5 minuto
	Extensão	72°C	1 minuto
35	Desnaturação	95°C	30 segundos
	Anelamento	57°C	1,5 minuto
	Extensão	72°C	1 minuto
	Extensão Final	72°C	3 minutos

As fitas direta e reversa das sequências resultantes foram conferidas, editadas e usadas para construir uma fita consenso usando o programa Sequencher 4.1.4. Cada sequência consenso foi submetida a uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para conferir se não houve contaminação e se as sequências correspondem ao gene e táxon de interesse. Sequências adicionais disponíveis no Genbank, bem como sequências geradas em trabalhos prévios no Laboratório de Entomologia (UFRJ), também foram incorporadas nas análises para realizar as associações, especialmente sequências geradas em Jardim (2015). O alinhamento das sequências foi feito com auxílio do programa Clustal W no programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2011), o qual também foi usado para calcular as distâncias genéticas das sequências, com o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) e para gerar uma árvore de *Neighbour-Joining*. O alinhamento total incluiu um total de 97 sequências (Tabela 5) com 587 pares de base. O suporte de ramos foi avaliado usando o método do *bootstrap* em 1000 réplicas.

Tabela 4. Espécies com sequências do gene COI incluídas no alinhamento com respectivas informações taxonômicas e de procedência. O código de voucher se refere ao código de referência do espécime testemunho com sequência obtida em laboratório.

Espécie/ Morfotipo	Estágio de vida	Origem da sequência	Código de voucher	Localidade
<i>Leptonema agraphum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT214	São Paulo
<i>Leptonema amplifurcatum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT300	RJ, Angra dos Reis
<i>Leptonema bifurcatodes</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT301	RJ, Itatiaia
<i>Leptonema bifurcatodes</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT377	RJ, Itatiaia
<i>Leptonema bifurcatum</i>	Adulto	GenBank	KX142541	MG, PN Caparaó
<i>Leptonema ferelunatum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT213	RJ, Teresópolis
<i>Leptonema ferelunatum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT1899	RJ, Petrópolis
<i>Leptonema pallidum</i>	Adulto	GenBank	KX142237	SP, Altinópolis
<i>Leptonema pallidum</i>	Adulto	GenBank	KX143219	RJ, Macaé
<i>Leptonema pallidum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT1893	RJ, Itatiaia
<i>Leptonema pallidum</i>	Adulto	Genbank	KX103282	MG, Serra do Cipó
<i>Leptonema santosi</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT215	RJ, Petrópolis
<i>Leptonema santosi</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT307	RJ, Petrópolis
<i>Leptonema serratum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT259	RJ, Nova Friburgo
<i>Leptonema stigmaticum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT1079	RJ, Nova Friburgo
<i>Leptonema tridens</i>	Adulto	GenBank	KX141842	RJ, Itatiaia
<i>Leptonema tridens</i>	Adulto	GenBank	KX144684	São Paulo
<i>Leptonema tridens</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT309	São Paulo
<i>Leptonema trispicatum</i>	Adulto	GenBank	KX143075	São Paulo
<i>Leptonema trispicatum</i>	Adulto	GenBank	KX143258	Paraná
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	GenBank	KX142982	Minas Gerais
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	GenBank	KX144409	Minas Gerais
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT437	RJ, Casimiro de Abreu
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT439	RJ, Angra dos Reis
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT440	RJ, Macaé
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT441	RJ, São Fidélis
<i>Leptonema viridianum</i>	Adulto	JARDIM 2015	ENT438	RJ, Mendes
<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Presente trabalho	ENT3620	RJ, Guapimirim
<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Presente trabalho	ENT3621	RJ, Teresópolis
<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Presente trabalho	ENT3622	RJ, Teresópolis
<i>Leptonema</i> sp. 1	Larva	Presente trabalho	ENT3641	RJ, Guapimirim
<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Presente trabalho	ENT3623	RJ, Teresópolis
<i>Leptonema</i> sp. 2	Larva	Presente trabalho	ENT3975	RJ, Teresópolis
<i>Leptonema</i> sp. 3	Larva	Presente trabalho	ENT3976	RJ, Teresópolis
<i>Macronema aff. immaculatum</i>	Adulto	Presente trabalho	ENT3989	RJ, Petrópolis
<i>Macronema aff. partitum</i>	Adulto	Presente trabalho	ENT4015	RJ, Guapimirim
<i>Macronema</i> sp.	Larva	Presente trabalho	ENT3630	RJ, Teresópolis
<i>Macronema</i> sp.	Larva	Presente trabalho	ENT3631	RJ, Teresópolis
<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Presente trabalho	ENT3617	RJ, Guapimirim
<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Presente trabalho	ENT3618	RJ, Guapimirim
<i>Macrostemum</i> sp.	Larva	Presente trabalho	ENT3619	RJ, Guapimirim
<i>Macrostemum digramma</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3990	RJ, Guapimirim

<i>Macrostemum digramma</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3987	RJ, Teresópolis
<i>Macrostemum brasilienses</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3984	RJ, Teresópolis
<i>Macrostemum erichson</i>	Adulto	GenBank	KX294870	AM, Manaus
<i>Macrostemum hyalinum</i>	Adulto	GenBank	KX294504	Venezuela
<i>Macrostemum hyalinum</i>	Adulto	GenBank	KX295260	Rondônia
<i>Macrostemum hyalinum</i>	Adulto	GenBank	KX295343	Rondônia
<i>Macrostemum ulmeri</i>	Adulto	GenBank	KX143228	Venezuela
<i>Smicridea (Rhyachophylax) coronate</i>	Adulto	GenBank	KX106703	MG, Serra do Cipó
<i>Smicridea (Rhyachophylax) coronate</i>	Adulto	GenBank	KX104079	São Paulo
<i>Smicridea (Rhyachophylax) discalis</i>	Adulto	GenBank	KX105834	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) discalis</i>	Adulto	GenBank	KX107132	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) froelhichi</i>	Adulto	GenBank	ENT3772	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) froelhichi</i>	Adulto	GenBank	ENT3773	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp. 3</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3794	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp. 3</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3795	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp. 3</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3801	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp. 3</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3803	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) iguazu</i>	Adulto	GenBank	KX107272	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) iguazu</i>	Adulto	GenBank	KX107618	RJ, Macaé
<i>Smicridea (Rhyachophylax) jundiai</i>	Adulto	GenBank	KX107063	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) jundiai</i>	Adulto	GenBank	KX103398	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) jundiai</i>	Adulto	GenBank	KX142681	São Paulo
<i>Smicridea (Rhyachophylax) ralphi</i>	Adulto	GenBank	KX144435	RJ, Cach. de Macacu
<i>Smicridea (Rhyachophylax) ralphi</i>	Adulto	GenBank	KX142093	RJ, Cach. de Macacu
<i>Smicridea (Rhyachophylax) ralphi</i>	Adulto	GenBank	KX144016	RJ, Macaé
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp. 5</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3799	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) sp.5</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3800	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Rhyachophylax) spinulosa</i>	Adulto	GenBank	KX143053	São Paulo
<i>Smicridea (Rhyachophylax) spinulosa</i>	Adulto	GenBank	KX105978	Paraná
<i>Smicridea (Rhyachophylax) spinulosa</i>	Adulto	GenBank	KX142834	Paraná
<i>Smicridea (Rhyachophylax) unguiculata</i>	Adulto	GenBank	KX142992	SP, Altinópolis
<i>Smicridea (Rhyachophylax) vermiculata</i>	Adulto	GenBank	HM065502	Minas Gerais
<i>Smicridea (Rhyachophylax) vermiculata</i>	Adulto	GenBank	HM065501	MG, Serra do Cipó
<i>Smicridea (Rhyachophylax) vermiculata</i>	Adulto	GenBank	HM065503	Minas Gerais
<i>Smicridea (Smicridea) albosignata</i>	Adulto	GenBank	HM065052	MG, Serra do Cipó
<i>Smicridea (Smicridea) albosignata</i>	Adulto	GenBank	HM065054	MG, Serra do Cipó
<i>Smicridea (Smicridea) palífera</i>	Adulto	GenBank	HM065391	Venezuela
<i>Smicridea (Smicridea) palífera</i>	Adulto	GenBank	KX106454	Venezuela
<i>Smicridea (Smicridea) palífera</i>	Adulto	GenBank	HM065392	RJ, Cach. de Macacu
<i>Smicridea (Smicridea) palífera</i>	Adulto	GenBank	ENT3774	RJ, Teresópolis
<i>Smicridea (Smicridea) paranensis</i>	Adulto	GenBank	HM065395	Minas Gerais
<i>Smicridea (Smicridea) paranensis</i>	Adulto	GenBank	KX142436	Argentina
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 1</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3785	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 1</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3832	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 1</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3983	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 2</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3979	RJ, Teresópolis
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 2</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3980	RJ, Teresópolis
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 2</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3834	RJ, Teresópolis
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 2</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3833	RJ, Teresópolis

<i>Smicridea (Smicridea) sp. 4</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3798	RJ, Guapimirim
<i>Smicridea (Smicridea) sp. 6</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3805	RJ, Teresópolis
<i>Smicridea, (Smicridea) sp. 6</i>	Larva	Presente trabalho	ENT3806	RJ, Teresópolis
<i>Alterosa falcate</i>	Adulto	GenBank	KX104937	RJ, Teresópolis
<i>Alterosa orgaosensis</i>	Adulto	GenBank	KX104862	São Paulo
<i>Alterosa truncate</i>	Adulto	GenBank	KX103562	São Paulo

3.8. Critérios para associação de larvas e adultos de Hydropsychidae

Zhou e colaboradores (2007) estabeleceram alguns critérios pelos quais a associação de larvas a adultos pode ser considerada mais confiável: se as sequências forem idênticas ou se as sequências de larva estiverem aninhadas em um clado com sequências de adultos identificados em espécie. Quando as sequências de larva não estiverem em um mesmo clado que as sequências de adultos identificados ou mesmo quando formando um clado, as sequências de larvas não estiverem aninhadas, não é considerado associado, sendo necessário aumentar a amostragem de adultos e larvas até que os critérios de associação sejam atendidos (Fig.9).

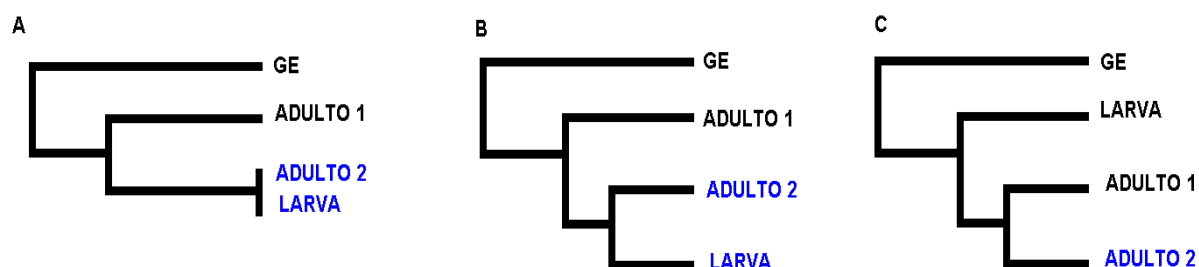


Figura 8. A- A larva é considerada associada se as sequências foram idênticas. B- A larva é considerada associada se estiver aninhada em um mesmo clado que um adulto identificado em espécie. C- É necessário aumentar a amostragem de adultos até que os critérios de associação sejam atendidos. GE= grupo-externo.

5. Resultados

5.1. Associação de larvas e adultos

Neste estudo foi possível associação entre larvas e adultos de 3 espécies de *Leptonema*, 3 espécies de *Smicridea* e 1 espécie de *Macronema*. Essas espécies foram associadas através de sequências de DNA mitocondrial com base em distâncias genéticas.

Das 7 espécies associadas, a espécie *Smicridea (Rhyachophylax) froehlichii* já havia sido associada por meio do metamorfótipo (Gomes 2016) e o presente trabalho corrobora a associação por meio da análise de sequências de DNA e faz uma nota na descrição relatando algumas características morfológicas que mostraram variação. As sequências de larvas de *Macrostemum* sp. e *Smicridea* sp. 1, *Smicridea* sp.4 e *Smicridea* sp.6 que foram inseridas na análise, não foram associadas.

O filograma gerado na análise de neighbor-joining (NJ) das 97 sequências (Fig. 8) de COI, inclui três sequências como grupos-externos pertencentes a subordem Annulipalpia (*Alterosa falcata* Blahnik, 2005, *A. truncata* Blahnik, 2005 e *A. orgaosensis* Blahnik, 2005), 34 sequências de *Leptonema*, 46 sequências de *Smicridea*, 11 sequências de *Macrostemum* e 3 sequências de *Macronema*. Na árvore de NJ foram recuperados 4 grandes grupos, correspondendo aos gêneros de Hydropsychidae estudados: *Leptonema*, *Smicridea*, *Macronema* e *Macrostemum*. Além disso, os subgêneros de *Smicridea*, *Smicridea* e *Rhyachophylax* também formaram grupos monofiléticos.

Com relação ao gênero *Leptonema*, foi possível definir três associações de larvas a adultos identificados em espécie, sendo que apenas uma delas atende os critérios estabelecidos por Zhou e colaboradores (2007). Outras duas, embora não atendam tais critérios, foram definidas com base na posição das sequências de larvas na árvore de NJ e nas baixas distâncias genéticas de tais sequências com sequências de adultos identificados em espécie.

Sequências de larvas identificadas como *Leptonema* sp. 2 foram recuperadas dentro de um ramo contendo indivíduos adultos de *Leptonema pallidum* Guérin, 1834. Os indivíduos adultos incluídos nesta linhagem são do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. As sequências de larvas de *Leptonema* sp 2 do PARNASO foram idênticas às dos adultos do Rio de Janeiro (distância de 0%). Incluindo os indivíduos de São Paulo e Minas Gerais, a distância intraespecífica máxima observada nessa espécie foi de 1,6%. A única sequência de larva de *Leptonema* sp. 3 obtida foi recuperada na mesma linhagem que o único indivíduo de

Leptonema santosi Jardim, Dumas & Nessimian, 2010 incluído na análise. Como a distância entre tais sequências foi de apenas 1,6% (Anexo 1), esta larva está sendo considerada como associada, embora seja necessário acrescentar mais dados para confirmar essa hipótese. Vale ressaltar que os Hydropsychidae geralmente apresentam valores altos de distância intraespecífica quando comparadas as sequências do gene COI. De forma similar, sequências das larvas de *Leptonema* sp. 1 apareceram em um mesmo ramo que indivíduos de *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010, mas não aninhadas. Contudo, as divergências genéticas entre as sequências de larvas e de adultos foram de no máximo 0,8%, de forma que também foi considerada como associada.

No gênero *Smicridea*, foram obtidas sequências de seis morfótipos de larvas, mas apenas dois foram associados a adultos, ambas do subgênero *Rhyachophylax*: *S. (R.) froehlichii* e *S. (R.) ralphi*. As sequências de larvas de *Smicridea (R.)* sp. 3 foram recuperadas dentro do mesmo ramo que sequências de indivíduos adultos de *S. (R.) froehlichii*, com distância genética observada de 0%. Esta associação corrobora a associação feita por Gomes, 2016, que utilizou o método do metamorfotipo ao descrever a larva dessa espécie. De forma semelhante, as sequências das larvas de *S. (R.)* sp. 5 foram recuperadas na mesma linhagem que indivíduos adultos de *S. (R.) ralphi*, com 0% de divergência genética.

No grupo do subgênero *Smicridea (Smicridea)* sp. 2 mostrou-se no filograma da mesma forma que os indivíduos de *L. pallidum* e *L. santosi*, a larva não se encontra aninhada em um mesmo ramo que indivíduos de *S.(S.) paranensis*. Considerando o valor de divergência intraespecífica máxima de 1,6%, esta larva foi considerada associada.

Embora tenham sido detectadas duas espécies de *Macronema* a partir dos adultos coletados no PARNASO, apenas para um indivíduo de uma delas foi obtida sequência do gene COI. Ainda assim foi possível a associação das larvas com esse adulto, identificado como *Macronema aff. immaculatum*, visto que foi observada uma divergência de 0% (Anexo 3).

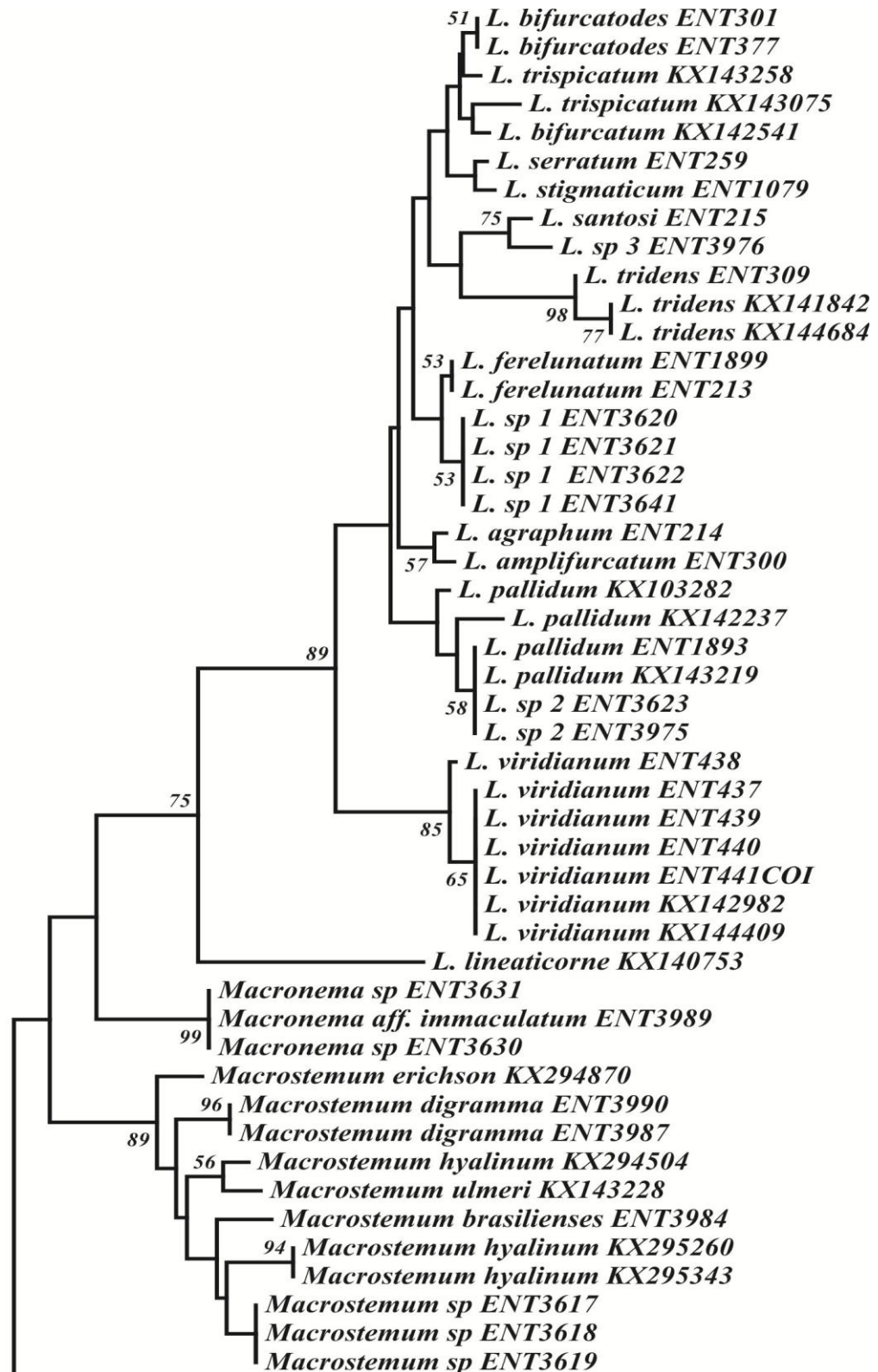


Figura 9. Filograma de *Neighbor-joining* para 97 seqüências de COI (587 bp) de Hydropsychidae coletados no PARNASO e três espécies de *Alterosa* (incluídas como grupos-externos), analisadas sob o modelo Kimura 2-Parâmetros. Valores em porcentagem de suporte de *bootstrap* maiores que 50% são mostrados sobre os clados.

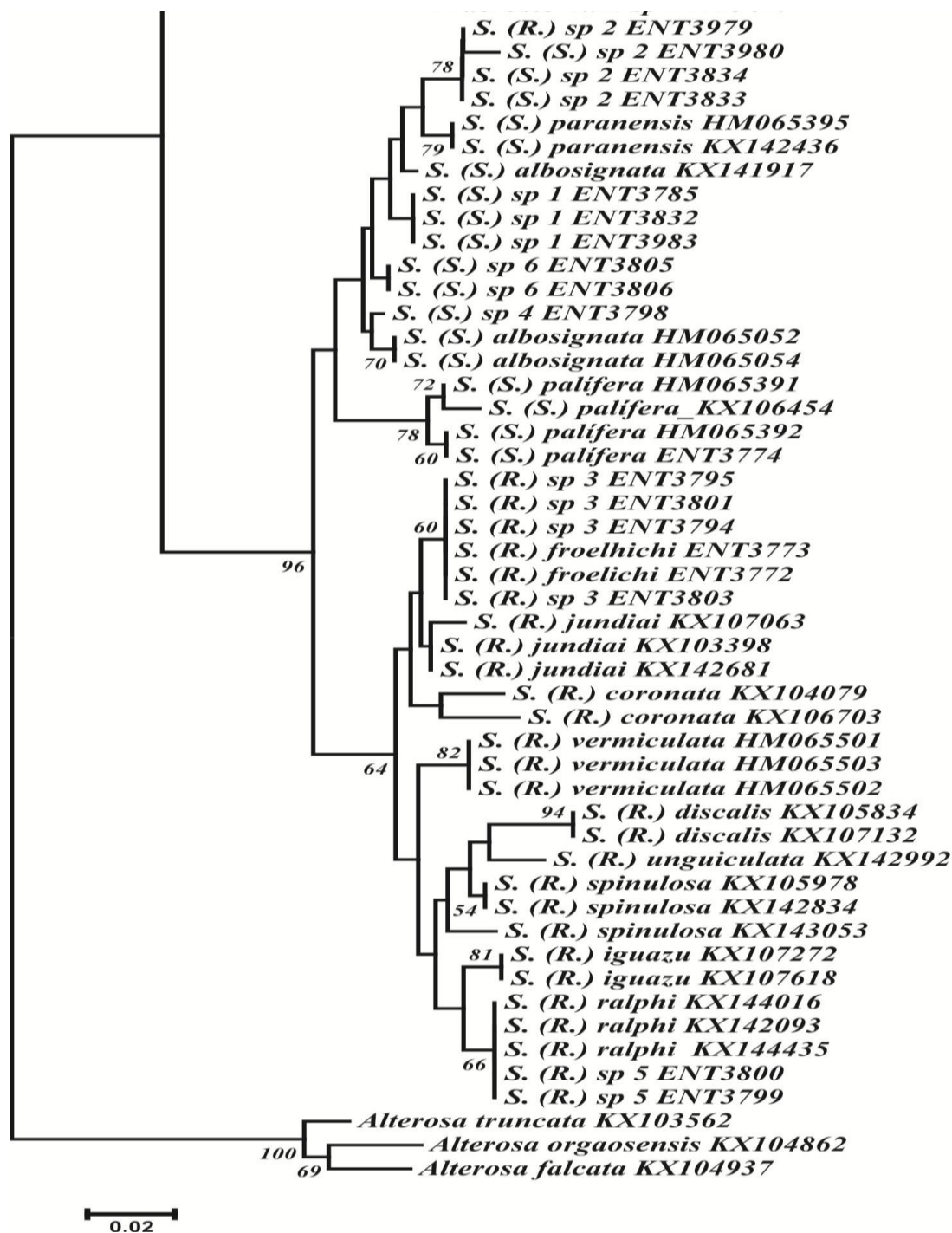


Figura 9. (Continuação). Filograma de *Neighbor-joining* para 97 seqüências de COI (587 bp) de *Leptonema*, *Macronema*, *Macrostemum*, *Smicridea* e *Alterosa* estabelecidas pelo modelo Kimura 2-Parâmetros. Valores em porcentagem de suporte de *bootstrap* maiores que 50% são mostrados sobre os clados.

5.2. Descrição das larvas associadas

5.2.1. Gênero *Leptonema*

O gênero *Leptonema* pertence à subfamília Macronematinae, da família Hydropsychidae, e contém atualmente 146 espécies no mundo, 15 das quais são registradas para o estado do Rio de Janeiro. Os adultos de *Leptonema* são tricópteros conspícuos, têm entre 10 e 30 mm de comprimento, asas com coloração variando desde quase transparente, marrons com máculas claras ou escuras (Flint *et al.* 1987). Poucas larvas são descritas na literatura ou encontram-se associados a algum adulto.

As larvas de *Leptonema*, geralmente são encontradas em rios ou riachos com correnteza de moderada a forte. Em geral, apresentam corpo robusto, cabeça e segmentos torácicos esclerosados, podem ser reconhecidas pelas brânquias abdominais com ramo principal e ramificações menores, e pelos abrigos fixos com uma rede de captura de alimento. Apesar da diversidade e abundância nos corpos d'água, apenas seis espécies de *Leptonema* têm a larva descrita. No Brasil até o momento foram associadas 4 espécies (*Leptonema tridens* Mosely, 1933; *L. amazonense* Flint, 1978; *L. maculatum*, 1933; *L. sparsum* (Ulmer), 1905). Alguns trabalhos constam descrições das larvas que não estão associadas (Muños-Quesada 1999; Pes 2005).

Das quatro espécies associadas no Brasil, 3 foram associadas e descritas por Pes 2005, em que as larvas associadas apresentaram peculiaridades se comparadas as demais larvas. As larvas de *L. amazonense* possuem comprimento de 18 mm, cabeça de cor castanho escura e com poucas cerdas, margem do frontoclípeo reta, mandíbulas pequenas e coxa serrilhada com 7 espinhos curtos na margem anterior e filamentos branquiais com poucos filamentos. Larvas de *L. maculatum* apresentam comprimento 17 mm, cabeça de cor castanho clara com inserções musculares mais claras, margem do frontoclípeo côncavo, mandíbulas pequenas, coxa com 7 espinhos finos e longos na margem anterior, filamentos branquiais com muitos filamentos. As larvas de *L. sparsum* possuem comprimento de 18 mm, cabeça de cor amarelo clara com inserções musculares mais escuras, margem do frontoclípeo côncava, coxa com 7 espinhos grossos na margem anterior, filamentos braquiais com muitos filamentos. A larva de *Leptonema tridens* foi associada e descrita por Nessimian e Dumas (2010), elas apresentam comprimento de 31.0-40.0 mm, cabeça de cor marrom, frontoclípeo sem cerdas com margem reta, coxa anterior com cerdas longas e curtas na margem anterior e apresenta uma dobra pontiaguda apical, filamentos branquiais com poucos filamentos. As larvas de *Leptonema*

pallidum, *Leptonema ferelunatum* e *L. santosi* tiveram sua primeira associação no presente trabalho e foram observadas características morfológicas que possibilitassem a distinção delas.

***Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010**

Larva (Figs. 10). Comprimento: 11,4 – 12,8 mm [n=5]

Cabeça. Dorsal (fig. 10B). Cabeça arredondada, marrom-escura; estemas com mancha oval amarelo-clara ao redor; margem anterior do frontoclípeo na região anterior com duas projeções arredondadas. Mandíbulas assimétricas (Fig.10D); ambas com cerdas laterais; mandíbula esquerda com um dente apicodorsal, dois dentes subapicais obtusos, subiguais, um apical arredondado, com escova de cerdas longas e finas, um dente molar arredondado maior; mandíbula direita com um dente apicodorsal, dois dentes subapicais obtusos, um apical arredondado maior, um dente molar arredondado, sem escova de cerdas; **Ventral** (Fig. 10C). Gena com sulcos estridulatórios transversais distintos, uniformemente marrom-escuros, com manchas amareladas, estendendo-se da região anterior à medianoventral da gena em direção posterolateral da pós-gena. Esclerito gular dividido em esclerito anterior e posterior; esclerito anterior triangular, mais largo que longo; esclerito posterior romboide e diminuto. **Tórax. Dorsal**. 3 notos torácicos esclerosados (Fig. 10E), cobertos por cerdas finas e curtas e com marcas de inserções musculares. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal. Mesonoto e metanoto apresentam sulcos oblíquos; **Lateral**. (Figs. 10F – H) Primeiro par de pernas torácicas de cor marrom-escura, com cerdas curtas e finas amareladas no fêmur. Segundo e terceiro par de pernas semelhantes com cerdas curtas de cor preta na região da coxa e fêmur. **Ventral**. Um par de brânquias no mesoesterno e metaesterno compostas de um filamento grosso se bifurcando em vários filamentos curtos. Trocantin triangular, pontiagudo, com cerdas finas. **Abdômen**. Coberto por cerdas curtas e finas; brânquias ventrais com dois pares na região ventral e um par na região ventrolateral nos segmentos I-VI, no segmento VII, apenas um par de brânquias ventrais. Segmento VIII com dois escleritos arredondados, com cerdas curtas e grossas. Segmento IX (Fig. 10J) com dois escleritos subtriangulares mais longos que a largura, margem posterior com cerdas longas; esclerito lateral presente; pequeno, arredondado e esclerosado, com cerdas curtas. Segmento X com papila anal membranosa dorsal. Par de falsas pernas anais com garras simples e tufo de muitas cerdas longas e finas.

Nota: As larvas de *Leptonema ferelunatum* associadas aqui diferenciam-se das larvas de *Leptonema pallidum*, bem como de larvas conhecidas para outras espécies, por apresentar frontoclípeo com duas projeções, inserções musculares bem marcadas nos notos torácicos. Já em *L. pallidum* o frontoclípeo possui margem crenulada e não são aparentes inserções musculares nos notos torácicos, como apresentado nos indivíduos de *L. ferelunatum*.

Biologia: A maioria das larvas foi coletada no substrato de pedra, com algumas sendo encontradas em raízes em áreas de correnteza. As larvas foram encontradas em diferentes altitudes, desde 365 m a 2.049 m.

Material examinado: Brasil: Rio de Janeiro: Teresópolis, Rio Paquequer 2^a ordem, trilha do Sino, S22°27'25,90" W43°1'24,1", 2049 m, 1 larva, 26-29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Cachoeira do papel, afluente Rio Beija-flor, S22°27'8,50" W43°0'54,80", 1682 m, 1 larva, 26-29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Guapimirim, Afluente do Rio Soberbo, Ruínas, S22°29'43,5" W42°59'51,1", 365 m, 3 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Afluente Rio Soberbo, Estrada, S22°29'39,7" W42°59'58,9", 370 m, 1 larva, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.

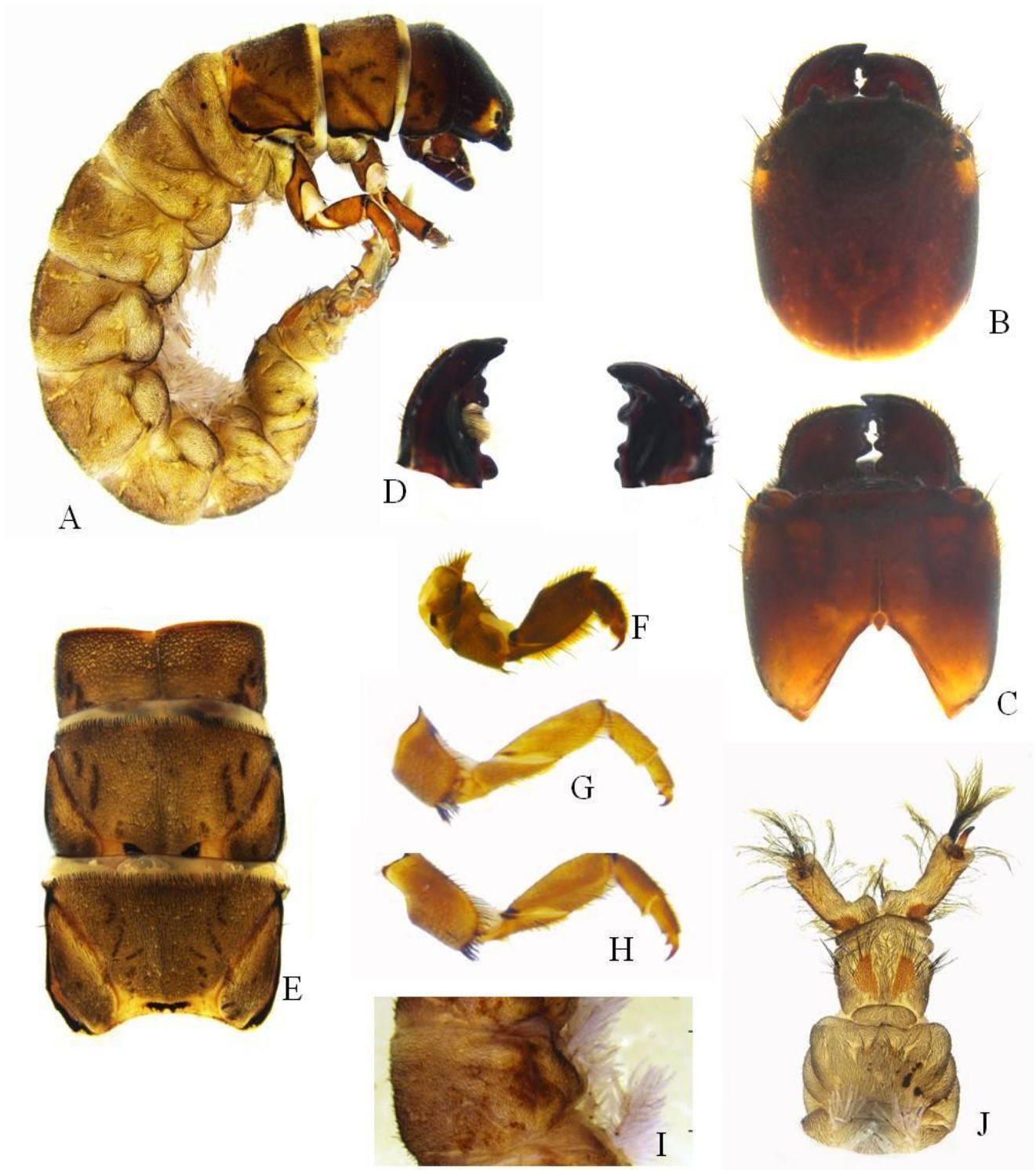


Figura 10. *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H pernas torácicas, face externa; I – brânquias, vista lateral; J – extremidade posterior do abdome e falsa perna anal, vista ventral.

***Leptonema pallidum* Guérin, 1834**

Larva (Fig. 11). Comprimento: 10,4 – 11,6 mm [n = 4].

Cabeça. Dorsal (Fig. 11B). Cabeça subretangular, marrom-escura. Estemas com mancha oval clara ao redor; manchas sobre a cabeça conspícua, amareladas em sua porção mediano-posterior; marcas de inserções musculares dorsais, forma ovais, claras; Frontoclípeo, com margem anterior marrom, convexa, crenulada. Mandíbulas assimétricas (Fig. 11D). Mandíbula esquerda com um dente apicodorsal, triangular, arredondado e um pouco maior que o dente molar, um dente molar obtuso, arredondado e 4 dentes subapicais triangulares, arredondados, subiguais, um apical ao lado do dente molar e de formato igual; com escova de cerdas dorso-mediana longas e finas entre o terceiro e quarto dente apical; mandíbula direita com um dente apicodorsal pontiagudo arredondado, um dente subapical achatado arredondado, menor que o segundo dente subapical, segundo dente subapical da mesma largura que o dente molar esquerdo, triangular e pouco arredondado na ponta e um dente molar obtuso, mais largo que o dente molar esquerdo, irregular. **Ventral** (Fig. 11D). Gena com sulcos estridulatórios distintos, transversais; uniformemente amarelo-escuros, contínuos, que se estende da região anterior à medianoventral da gena em direção a região posterolateral da pós-gena; marcas de inserções musculares, claras, levemente conspícuas, agrupadas na região posteroventral da gena, com poucos pares na região lateromedianamente. Esclerito gular ventral dividido em esclerito anterior e posterior; esclerito anterior triangular, mais largo que longo; esclerito posterior ventral semitriangular e diminuto.

Tórax. Notos torácicos esclerosados (Fig. 11E), cobertos por cerdas finas e curtas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal, metanoto com coloração marrom-clara. Mesonoto e metanoto inteiros, com sulcos oblíquos laterais; **Lateral.** (Figs. 11F – I) Primeiro par de pernas torácicas de cor marrom-escura, coxa apresenta um espinho apical pontiagudo, fêmur com cerdas curtas, finas e amareladas. Segundo e terceiro par de pernas semelhantes com poucas cerdas curtas de cor preta na região da coxa. **Ventral.** Um par de brânquias no mesoesterno e dois pares de brânquias metaesterno compostas de um filamento grosso se ramificando em vários filamentos curtos. Trocantin triangular, pontiagudo, alongado, com cerdas finas e curtas.

Ventral. Um par de brânquias no mesoesterno e dois pares de brânquias metaesterno compostas de um filamento grosso se bifurcando em vários filamentos curtos. Trocantin triangular, pontiagudo, com cerdas finas.

Abdômen. Coberto por cerdas curtas e finas; brânquias ventrais com um par na região ventral e dois pares na região ventrolateral nos segmentos I-IV e VI, no segmento VII, apenas um par de brânquias ventrais. No segmento V um par de brânquias ventrais. Segmento VIII com dois escleritos pequenos arredondados, com cerdas curtas e finas. Segmento IX (Fig. 11I) com dois escleritos subtriangulares mais longos que a largura, margem posterior com cerdas longas; esclerito lateral presente; pequeno, arredondado e esclerosado, com cerdas longas. Segmento X, papila anal membranosa dorsal pode estar retraída. Par de falsas pernas anais com garras simples e tufo de muitas cerdas longas e finas.

Nota: As larvas de *Leptonema pallidum* diferenciam-se das larvas de *Leptonema tridens* Mosely, 1933 por apresentar na cabeça em vista dorsal, marcas de inserções musculares, de forma circular na região posterior. Em *L. tridens*, no primeiro par de pernas torácicas apresenta uma dobra pontiaguda apical na coxa, ao qual não está presente em *L. pallidum*.

Biologia: As larvas foram coletadas em substratos de pedra e de folhiço em trechos de correnteza. As larvas de *L. pallidum* foram encontradas em altitudes de 950 a 1330 m.

Material examinado: Brasil: Rio de Janeiro: Teresópolis. Rio Paquequer (ponte), S22°27'22,8" W42°59'48,6", 1135m, 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Rio Paquequer, Cachoeira do Coreto, S22°26'8,52,6" W42°59'4,9", 950m, 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Afluente do Rio Paquequer (estrada), S22°27'18,7" W42°59'56,9", 1142m, 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva, col.; Afluente do Rio Beija-flor, Trilha do Sino, S22°26'53,8" W43°0'27,4", 1330m, 1 larva, 26-29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva, col.

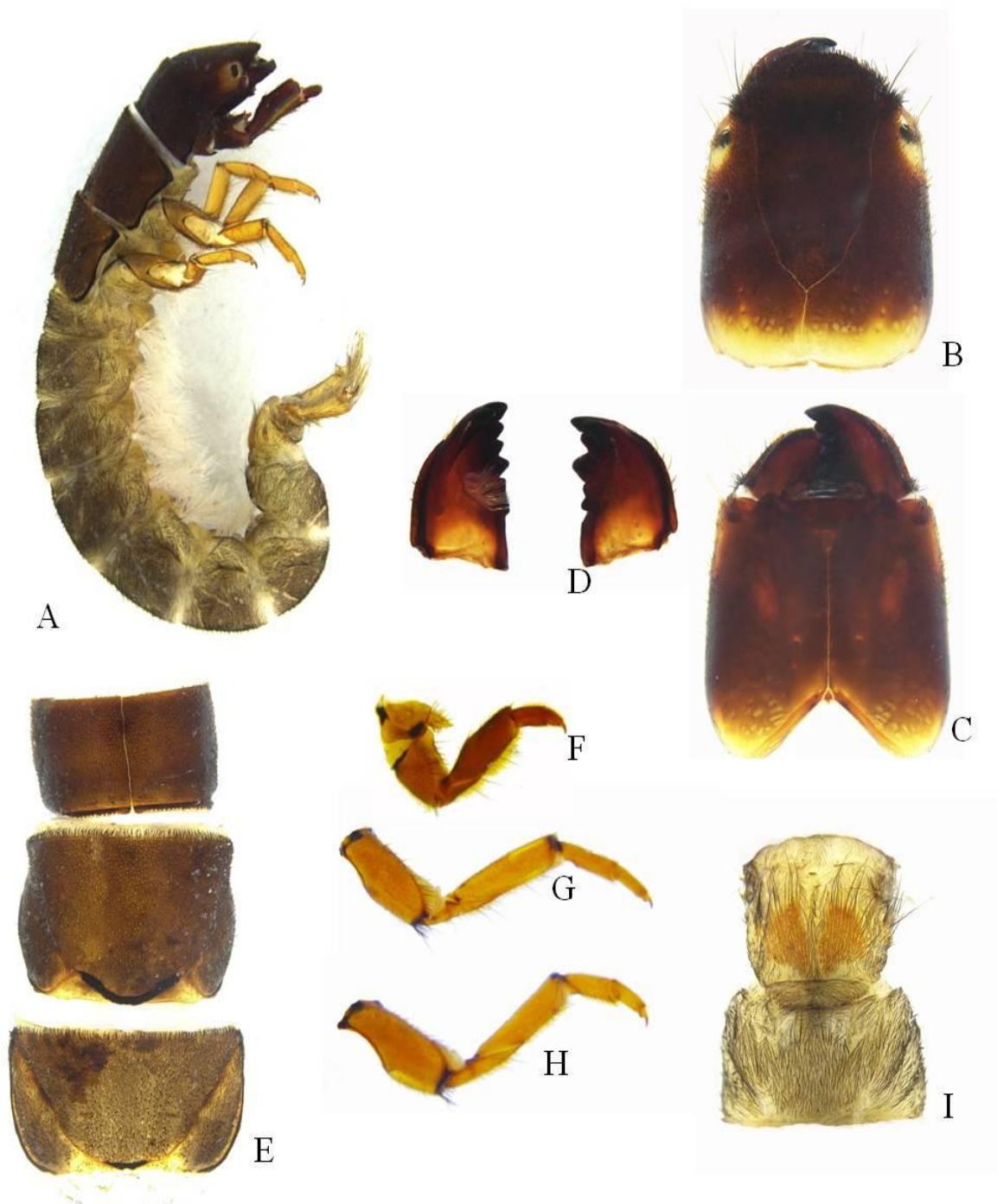


Figura 11. *Leptonema pallidum* Guérin, 1834, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H - pernas torácicas, face externa; I – Extremidade posterior do abdome, vista ventral.

Leptonema santosi Jardim, Dumas & Nessimian, 2010

Larva (Fig. 12). Comprimento: 11,3 mm – 12,0 mm [n = 2].

Cabeça. Dorsal (Fig. 12B). Cabeça subretangular, marrom-escuro. Estemas com mancha oval clara ao redor; marcas de inserções musculares dorsais, forma oval, claras; Frontoclípeo, com margem anterior marrom, côncava na porção mediana, com cerdas bem curtas na margem. Labro semicircular, com escova de cerdas nas laterais e cerdas curtas na superfície da região anterior a mediana. Mandíbulas assimétricas (Fig. 12D), ambas com cerdas laterais; mandíbula esquerda com um dente apicodorsal, triangular, pontudo, maior que o dente molar, um dente molar obtuso, irregular, retilíneo e três dentes subapicais arredondados, subiguais, dois menores que o terceiro dente apical, com escova de cerdas dorsomediana longas e finas entre o terceiro dente apical e o dente molar; mandíbula direita com um dente apicodorsal pontiagudo arredondado, um dente subapical bem achatado arredondado, com uma escova de cerdas curta; um dente apical triangular, arredondado na ponta fusionado ao dente molar; dente molar irregular, arredondado e menos largo que o dente obtuso esquerdo. **Ventral** (Fig. 12C). Gena com sulcos estridulatórios distintos, transversais; marcas de inserções musculares, claras, levemente conspícuas, algumas irregulares, outras circulares, agrupadas na região posteroventral da gena. Submento semicircular de mesma largura que o esclerito gular anterior. Esclerito gular dividido; esclerito anterior triangular, mais largo que longo; esclerito posterior em forma de losango e diminuto.

Tórax. Notos torácicos esclerosados (Fig. 12E), cobertos por cerdas finas e curtas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal. Mesonoto e metanoto inteiros, com sulcos oblíquos lateral; **Lateral.** (Figs. 12F-H) Primeiro par de pernas torácicas de cor marrom-escuro, coxa com um espinho apical dorsoventral, cerdas curtas e finas amareladas no fêmur e na tíbia. Segundo e terceiro par de pernas semelhantes com poucas cerdas curtas de cor preta na região da coxa, fêmur mais comprido que a coxa.

Abdômen. Coberto por cerdas curtas e finas; brânquias ventrais com um par na região ventral e dois pares na região ventrolateral nos segmentos I-VI, no segmento VII, apenas um par de brânquias ventrais. No segmento V, um par de brânquias ventrais. Segmento IX (Fig. 13I) com dois escleritos subtriangulares mais longos que a largura, margem posterior com cerdas longas; esclerito lateral presente; pequeno, arredondado e esclerosado, com cerdas longas. Par de falsas pernas anais com garras simples e tufo de muitas cerdas longas e finas.

Nota: Comparando com outras larvas de *Leptonema* conhecidas, as de *Leptonema santosi* são mais semelhantes àsquelas de *L. tridens*. Contudo, essas duas espécies diferem principalmente quanto à estrutura das mandíbulas, o dente molar de *L. tridens* tem uma reentrância na lateral

posterior, enquanto em *L. santosi*, não há reentrância (fig....). O segundo dente subapical em *L. santosi* é triangular e maior, comparado ao de *L. tridens* que é mais largo. No primeiro par de pernas, na coxa há um espinho com curvatura apical em *L. tridens*, já em *L. santosi* o espinho é pontudo e pouco curvado.

Biologia: Foram coletadas apenas duas larvas de *L. santosi*, uma em altitude de 1.135 m e outra em 1.280 m, ambas as larvas sendo encontradas em substrato rochoso.

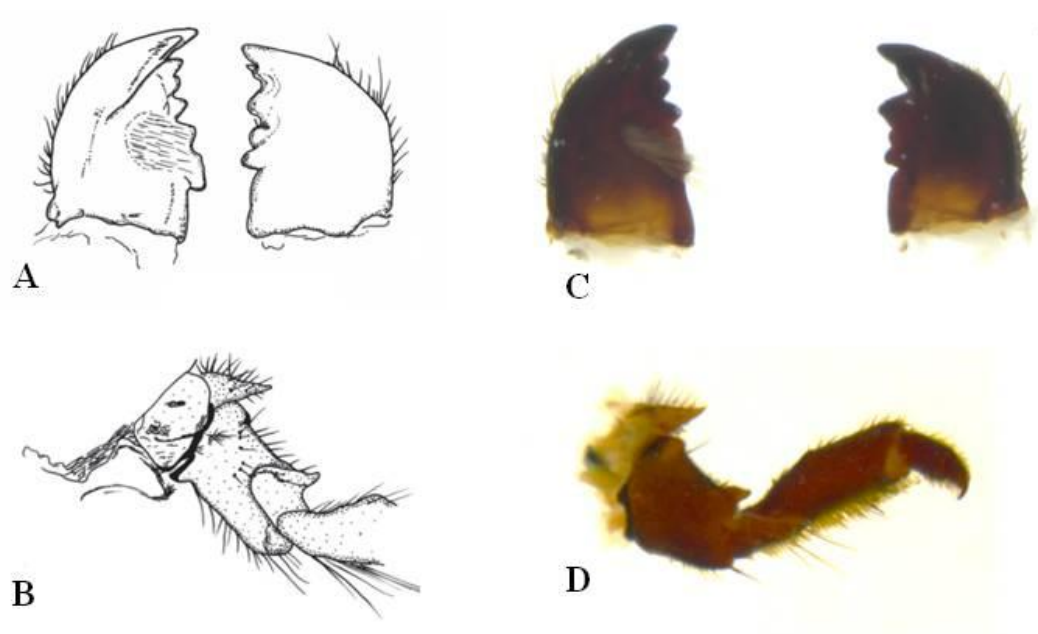


Figura 13. Ilustração das estruturas comparada. Ilustrações A e B foram extraídas de Dumas & Nessimian, 2010. *Leptonema tridens*: A – mandíbula, vista dorsal; B – perna protorácica, vista lateral; *Leptonema santosi*: C – mandíbula, vista dorsal; D – perna protorácica, vista lateroventral.

Material examinado: Brasil: Rio de Janeiro: Teresópolis. Rio Paquequer (ponte), S22°27'22,8" W42°59'48,6", 1135m, 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Rio Beija-flor (acima da represa), S22°26'50,90" W43°0'19,40", 1280m, 1 larva, 26-29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.

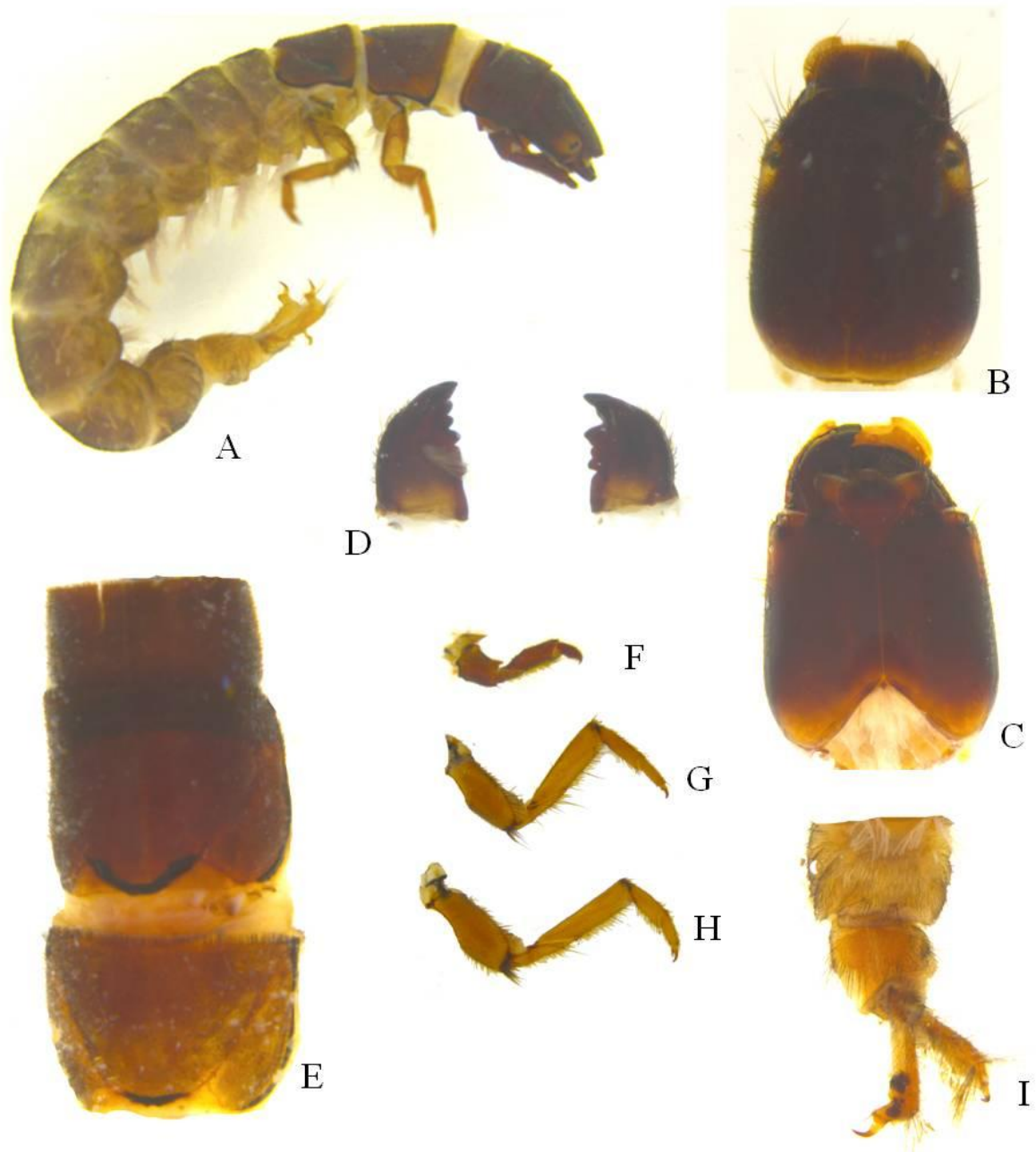


Figura 12. *Leptonema santosi*, Dumas & Nessimian, 2010, larva.. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal. ; E - notos torácicos, vista dorsal; F –H – pernas torácicas, vista dorsal; I – extremidade posterior do abdome e falsa perna anal, vista ventral.

5.2.2. Gênero *Smicridea*

A subfamília Smicrideinae contém somente três gêneros: *Smicrophylax* Neboiss, *Asmicridea* Mosely e *Smicridea* McLachlan (Morse 2016). As espécies do gênero *Smicridea* estão agrupadas em dois subgêneros, *Smicridea* McLachlan e *Rhyacophylax*. No Brasil, *Smicridea* possui 56 espécies validas, sendo 14 no subgênero *Smicridea* e 39 em *Rhyacophylax* (Pes & Santos, 2018).

Os adultos são pequenos (5 a 10 mm de comprimento) quando comparados aos outros gêneros de Hydropsychidae, possuem antenas mais curtas que o comprimento das asas anteriores e apresentam asas com coloração característica que varia do preto ao cinza com bandas brancas ao amarelo-claro ou castanho-claro (Gomes, 2015).

Atualmente, são conhecidas as larvas de 35 espécies. As larvas geralmente apresentam características distintivas, tais como: as manchas na área dorsal cabeça; o labro com cerdas pectinadas e com manchas escuras; a margem anterior do frontoclípeo côncava, convexa ou reta com crenulações ou projeções; a gena com sulcos estridulatórios transversais conspícuos; o esclerito gular ventral dividido em anterior e posterior; o pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal; o meso- e metanoto inteiros; o trocantin anterior simples, cônico; as brânquias ventrais e ventrolaterais com um ramo grosso ramificando-se na base; o abdômen coberto com cerdas curtas espatuladas como escamas.

***Smicridea (Rhyacophylax) ralphi* Almeida & Flint, 1974**

Larva. (Figs. 14) Comprimento 4,5 – 5,1 mm [n = 3].

Cabeça. Dorsal (Fig. 14B) Cabeça subrectangular, amarelo-clara. Estemas com mancha oval clara ao redor; manchas sobre a cabeça conspícuas; Frontoclípeo com margem anterior marrom-escura, crenulada; sutura do frontoclípeo em forma de V, igualmente marcada em sua extensão. Carena dorsal presente. Labro semicircular; superfície dorsal clara, com numerosas cerdas curtas e finas, sobre a margem anterior. Mandíbulas assimétricas (Fig. 14D), ambas com cerdas laterais; mandíbula esquerda com 1 dente apicodorsal, 1 dente molar obtuso, 2 dentes subapicais pontiagudos, subiguais, 1 apical pontiagudo; com escova de cerdas dorsomediana longas e finas; mandíbula direita com 1 dente apicodorsal, 1 dente molar obtuso, 2 dentes subapicais pontiagudos, 1 apical pontiagudo maior; sem escova de cerdas.

Ventral (Fig. 14C). Gena com sulcos estridulatórios transversais, fracamente marcados, finos; em forma retangular, que se estende da região anterior a medianoventral da gena em direção à região posterolateral da pós-gena; Esclerito gular ventral dividido em escleritos anterior e

posterior; esclerito anterior triangular, mais largo que longo; esclerito posterior ventral diminuto ou indistinto.

Tórax. Dorsal. Notos torácicos esclerosados (Fig. 14E); pro, meso e metanoto cobertos por cerdas curtas e finas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal, meso e metanoto inteiros; **Ventral.** Brânquias no prosterno ausentes, mesosterno com 1 par ventrolateral, metasterno com 1 par ventrolateral, compostas por um filamento grosso se ramificando próximo à base irregularmente em vários filamentos. **Lateral.** (Figs. 14F-H) Pernas torácicas de cor amarelo-clara, sem modificações, perna anterior mais curta que a mediana e a posterior; coxa da perna anterior com fileira de cerdas escuras, fêmur com fileira de cerdas, tarso com distintas cerdas claras e curtas; trocantin cônico, com cerdas grossas dorsais.

Abdômen. Coberto por cerdas curtas em forma de escamas achatadas; brânquias ventrais com 2 pares nos segmentos I-VI; brânquias ventrolaterais com 1 par nos segmentos I-VI e VII; brânquias laterais ausentes. Segmento VIII com dois escleritos circulares, com cerdas curtas na região anteromediana. Esterno IX (Fig. 14I) com dois escleritos subtriangulares mais longos que a largura de sua margem posterior, com cerdas curtas na região anteromediana e cerdas longas na margem posterolateral, esclerito lateral presente; par de falsas pernas anais com garra simples e tufo de cerdas longas dorsais em cada um.

Nota: As larvas de *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi* é similar à larva de *Smicridea (Rhyachophylax) caligata*, a qual foi descrita por Flint, 1974, ambas apresentam margem anterior do frontoclipeo crenulada, mas enquanto em *Smicridea (Rhyachophylax) caligata* a margem é de forma retilínea, em *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi* a margem é côncava. A carena na cabeça é outra característica que as diferenciam, em *Smicridea (R.) ralphi* está presente e ausente em *Smicridea (R.) caligata*.

Biologia: As larvas foram coletadas em folhíço de correnteza, sendo encontrados nos pontos de altitudes mais baixas (367-380 m).

Material examinado: Brasil: Rio de Janeiro: Guapimirim: Rio Soberbo, próximo à capela, S22°29'38,9" W42°59'49,5", 367m, 2 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Poço da Preguiça, S22°29'33,9" W43°0'5,8", 380m, 1 larva, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.

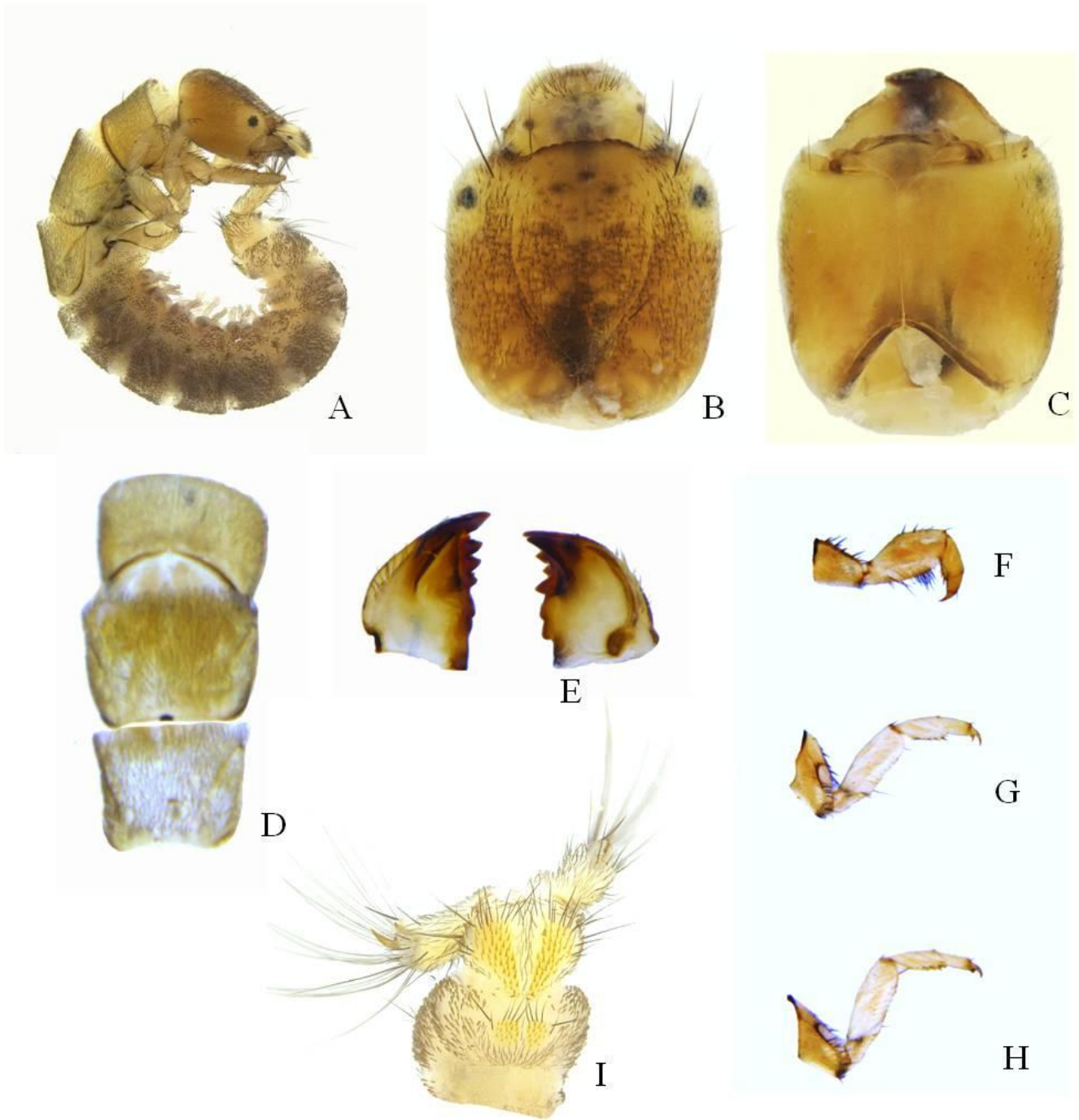


Figura 15. *Smicridea (Rhyachophylax) ralphi* Almeida & Flint, 1974, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – H – pernas torácicas, face externa; I – extremidade posterior do abdome;

Smicridea (Rhyachophylax) froehlichii

Descrição

Larva (Figs. 15). Comprimento 9,6 – 10,4 mm [n = 7].

Cabeça. Dorsal (Fig.15B-C). Cabeça arredondada, marrom-escura ou preta. Estemas com mancha oval clara ao redor; manchas na cabeça inconspícuas; marcas de inserções musculares dorsais de forma circular e escuras; cerdas grossas como espinhos, presentes ao redor dos estemas, na região anterolateral do frontoclípeo e dorsolateralmente até a porção mediana da cabeça. Carena dorsal ausente. Frontoclípeo com a margem anterior preta, simétrica, reta, crenulada. Mandíbulas assimétricas (Fig. 15E), ambas com cerdas curtas e grossas nas margens laterais; mandíbula esquerda com 1 dente apicodorsal, 1 dente molar obtuso, 3 dentes subapicais pontiagudos, subiguais, 1 apical pontiagudo maior; com escova dorsomediana de cerdas longas e finas; mandíbula direita com 1 dente apicodorsal, 1 dente molar com uma elevação arredondada na margem posterior, 3 dentes subapicais com primeiro e terceiro levemente obtusos e maiores que o segundo, pontiagudo, 1 apical pontiagudo maior, sem escova de cerdas. **Ventral** (Fig. 15D). Gena com sulcos estridulatórios distintos, transversais; uniformemente marrom-escuros; se estendendo da região anterior a medianoventral da gena; marcas de inserções musculares de forma oval, escuras, presentes na região medianoposterior da gena e uma série distribuída lateralmente na pós-gena. Submento sem fissura mediana. Esclerito gular dividido em escleritos anterior e posterior; esclerito anterior triangular, mais largo que longo; esclerito posterior triangular e diminuto.

Tórax_Dorsal (Figs. 15F). Notos torácicos esclerosados; pronoto com região anterodorsal e lateral coberta por cerdas curtas, grossas e truncadas, como espinhos, meso e metanoto cobertos por cerdas curtas e finas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal, meso e metanoto inteiros; pronoto marrom-escuro com duas manchas amarelas, subtriangulares, anterodorsais ou de cor escura uniforme, mesonoto com mancha marrom-escura retangular mediana. **Ventral**. Brânquias no proesterno ausentes, mesoesterno com 1 par ventrolateral, metaesterno com 1 par ventrolateral compostas de filamentos grossos bifurcando-se próximo à base e uma simples composta por um filamento curto com 4 a 5 filamentos. **Lateral**. Pernas torácicas de cor marrom, sem modificações, similares no tamanho; perna anterior com fileira de cerdas escuras, curtas e grossas na região dorsal e ventral da coxa, fêmur com fileira de cerdas claras curtas,; trocantin cônico, com 4 cerdas grossas.

Abdômen. Coberto por cerdas curtas em forma de escamas achatadas/ marrons; brânquias ventrais com 2 pares nos segmentos I-VI; brânquias ventrolaterais com 1 par nos segmentos VII; brânquias laterais ausentes. Esterno VIII com dois escleritos subtriangulares. Esterno IX com dois escleritos subtriangulares, com cerdas curtas, grossas e pontiagudas e cerdas longas na margem posterolateral (Fig. 15H), esclerito lateral presente, pequeno e pouco esclerosado. Segmento X com papilas, (as quais podem estar retraídas). Par de falsas pernas anais com garra simples e tufo de muitas cerdas longas dorsais.

Biologia. — As larvas dessa espécie foram coletadas em substrato rochoso e de folhíço em trechos de correnteza e em localidades de altitudes baixas 347 – 380 m.

Nota. *S. (R.) froehlichii* teve a larva previamente associada no trabalho de Gomes (2015), em que a larva se distingue das demais larvas por apresentar as seguintes características: coloração da cabeça marrom-escura ou preta e dos notos torácicos, com pronoto de cor marrom-escura com duas manchas amarelas, subtriangulares, anterodorsais ou completamente enegrecido e mesonoto variando de amarelo a completamente enegrecido; presença de cerdas secundárias grossas, curtas truncadas e médias pontiagudas, presentes ao redor dos estemas, sobre a região anterolateral do frontoclípeo e dorsolateralmente até a porção mediana da cabeça; pronoto com região anterodorsal e lateral coberta por cerdas curtas e grossas truncadas, pernas médias e posteriores mais largos e comprimidos que nas demais espécies.

No presente trabalho, as larvas não possuem a região dorsal da cabeça totalmente de coloração marrom-escura, mas de coloração marrom-clara, com coloração marrom-escura na região do frontoclípeo, que em sua porção mediana apresenta variação de três a cinco manchas subtriangulares amareladas. Na região posterior ao frontoclípeo, na porção mediana dorsal apresenta uma mancha semicircular escura, com marcas de inserções musculares conspícuas. Na região ventral da cabeça, as marcas de inserções musculares não são claramente visíveis e de coloração marrom-escura, elas apresentam coloração bem clara, visíveis sob microscópio. Os sulcos estridulatórios apresentam coloração escura e bem demarcada, porém apresentam uma mancha circular na gena de cor preta na região medianolateral. As mandíbulas descritas por Gomes (2015) são robustas e de coloração escura. No presente trabalho, as mandíbulas também são robustas mas de coloração amarelo-clara e se comparadas são totalmente idênticas,

com exceção do dente molar da mandíbula direita, que apresenta uma elevação arredondada na margem posterior. Variações no padrão de coloração dos notos torácicos em larvas dessa espécie foram encontradas entre indivíduos de uma mesma população e entre populações diferentes (Gomes, 2015). No presente trabalho as larvas apresentaram apenas um padrão de coloração nos notos torácicos, levemente diferentes daquele descrito por Gomes (2015). É provável que tais variações sejam devido ao local onde as larvas são encontradas, visto que as larvas associadas em Gomes (2015) foram coletadas em na região sul do Brasil, em rios com características provavelmente bem distintas daqueles do PARNASO.

Material examinado. — **BRASIL: Rio de Janeiro:** Guapimirim, Rio Soberbo, próximo à capela, S22°29'38,9" W42°59'49,5", 367 m, 2 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A. Alves e A.L.R. Silva col.; Poço da Preguiça, S22°29'33,9" W43°0'5,8", 380 m, 3 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A. Alves e A.L.R. Silva col.; Represa final do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, S22°29'45,5" W42°59'49,7", 347 m, 2 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A. Alves e A.L.R. Silva col.

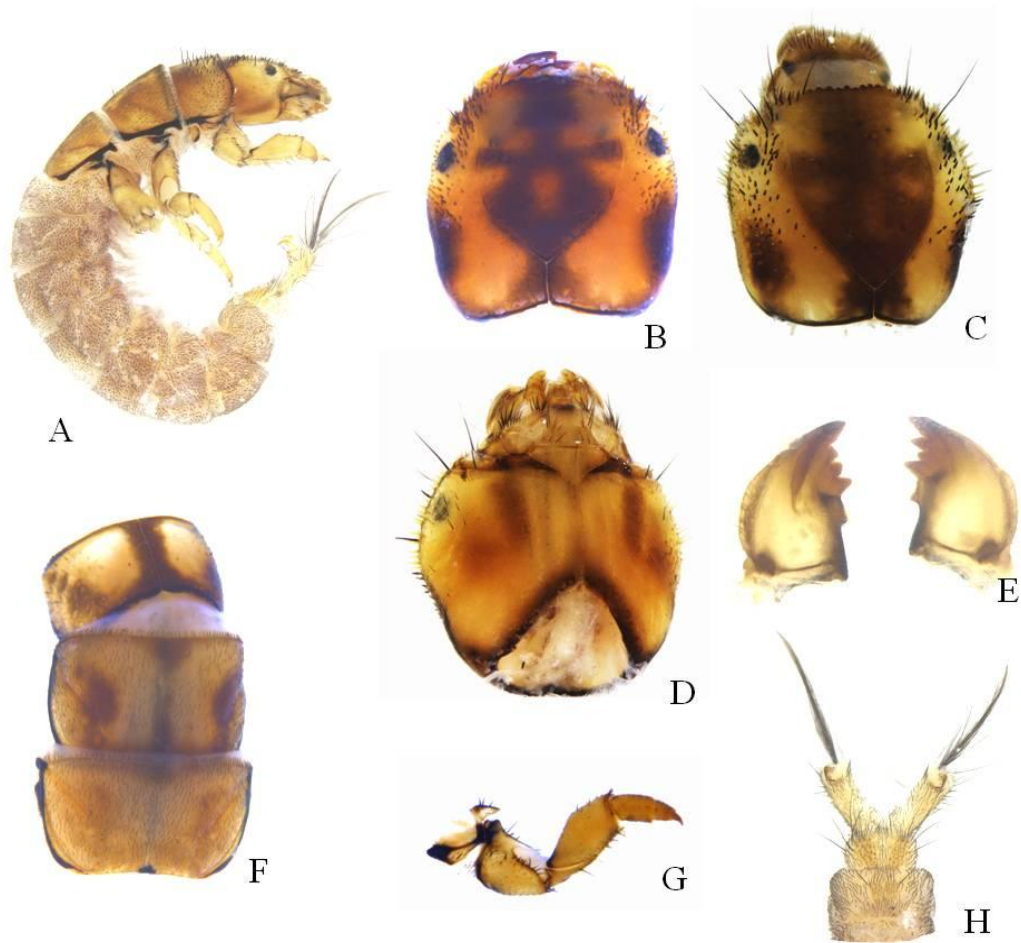


Figura 15. *Smicridea (Rhyachophylax) froehlichii* Almeida & Flint, 1974, larva. A – hábito, vista lateral; B, C – cabeça, vista dorsal; D – cabeça, vista ventral; E – mandíbulas, vista dorsal. ; E - notos torácicos, vista dorsal; F – perna protorácica, vista ventral; G – Segmentos abdominais VIII e IX e falsa perna anal, vista ventral.

Smicridea (Smicridea) paranensis

Larva (fig. 16 A). Comprimento 4,79 – 6,85 mm [n = 4].

Cabeça. Dorsal (Fig. 1BB). Cabeça subretangular, marrom. Estemas com mancha amarelada ao redor; sem manchas sobre a cabeça; marcas de inserções musculares, de forma oval, claras, na região mediana e posterior do frontoclípeo; cerdas curtas e finas, cobrindo toda superfície dorsal e lateral da cabeça. Carena dorsal ausente. Frontoclípeo com a margem anterior, simétrica, reta, crenulada; Labro com escova de cerdas laterais, com reentrância oval, marcada e uma mancha clara, quase transparente na lateral. Mandíbulas assimétricas (Fig. 16D), ambas com cerdas curtas e grossas nas margens laterais; mandíbula esquerda com 1 dente apicodorsal pontiagudo, 1 dente molar retangular, 3 dentes subapicais pontiagudos, subiguais, 2 dentes subapicais truncados, 1 apical pontiagudo truncado maior; com escova dorsomediana de poucas cerdas longas e finas; Mandíbula direita com 1 dente apicodorsal pontudo, 1 dente molar retangular e 3 dentes subapicais pontiagudos, o primeiro e terceiro maiores que o segundo dente, sem escova de cerdas. **Ventral** (Fig.16C). Gena com sulcos estridulatórios transversais, distintos; Esclerito gular ventral dividido; esclerito anterior ventral triangular; esclerito posterior ventral semitriangular e diminuto. **Tórax. Dorsal** (Fig. 16E). Notos torácicos esclerosados; pro, meso e metanoto cobertos por cerdas curtas e finas. Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal, meso e metanoto inteiros, de coloração marrom. **Lateral**. Pernas torácicas amarelas claras, sem modificações, similares no tamanho; perna anterior com cerdas, curtas na região dorsal; trocantin, curto, cônico, com algumas cerdas. **Ventral**. Brânquias no prosterno ausentes, mesosterno com 1 par ventrolateral, metasterno com 1 par ventrolateral compostas de filamentos grossos se bifurcando próximo a base de comprimento irregularmente e uma 1 simples ventromesal. **Abdômen**. Dorsal. Coberto por cerdas curtas em forma de escamas achatadas e poucas cerdas longas e finas, cutícula sem depressões; brânquias ventrais com 2 pares nos segmentos I-V; Segmento VI - VII com um ramo principal e poucas estrias, curtas. Brânquias laterais ausentes. Esterno VIII com um esclerito triangular, com cerdas curtas na região anteromediana. Esterno IX com dois escleritos subtriangulares mais largos que longos de sua margem posterior, com cerdas curtas na região anteromediana e cerdas longas na margem posterolateral, esclerito lateral presente, levemente esclerosado, com duas cerdas curtas. Segmento X com par de falsas pernas anais com garra simples e tufo de cerdas longas.

Biologia. — As larvas dessa espécie foram coletadas em altitudes entre 1332 e 367 m. Foram encontradas em substratos rochosos e folhiço em água corrente.

Nota. — A margem do frotoclípeo é igual nas larvas de *Smicridea* (*S.*) sp. 2 e *S.* (*S.*) sp. 3. A dentição das mandíbulas se diferencia de *S.* (*S.*) sp. 2 pela coloração e pelos dentes serem truncados. Nos indivíduos de *S.* (*S.*) sp. 3 (fig. 16), os dentes são pontudos e o dente obtuso direito é diferente.



Figura 17. Ilustração comparativa das mandíbulas das larvas. A – *Smicridea* (*Smicridea*) sp. 2; B – *Smicridea* (*Smicridea*) sp. 3.

Material examinado. — **BRASIL: Rio de Janeiro:** Guapimirim, Afluente Rio Soberbo, próximo a capela, S22°29'37,3" W42°59'54,4" 364m – 1 larva, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Afluente Rio Soberbo, estrada, S22°29'33,9" W43°0'05,8" 380m – 1 larva, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Teresópolis, Afluente Rio Paquequer, estrada S22°27'18,76" W42°59'56,90" 1142m - 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.; Rio Beija flor, acima da represa S22°26'50,90" W43°0'19,40" 1280m - 1 larva, 26-29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A.Alves e A.L.R.Silva col.;

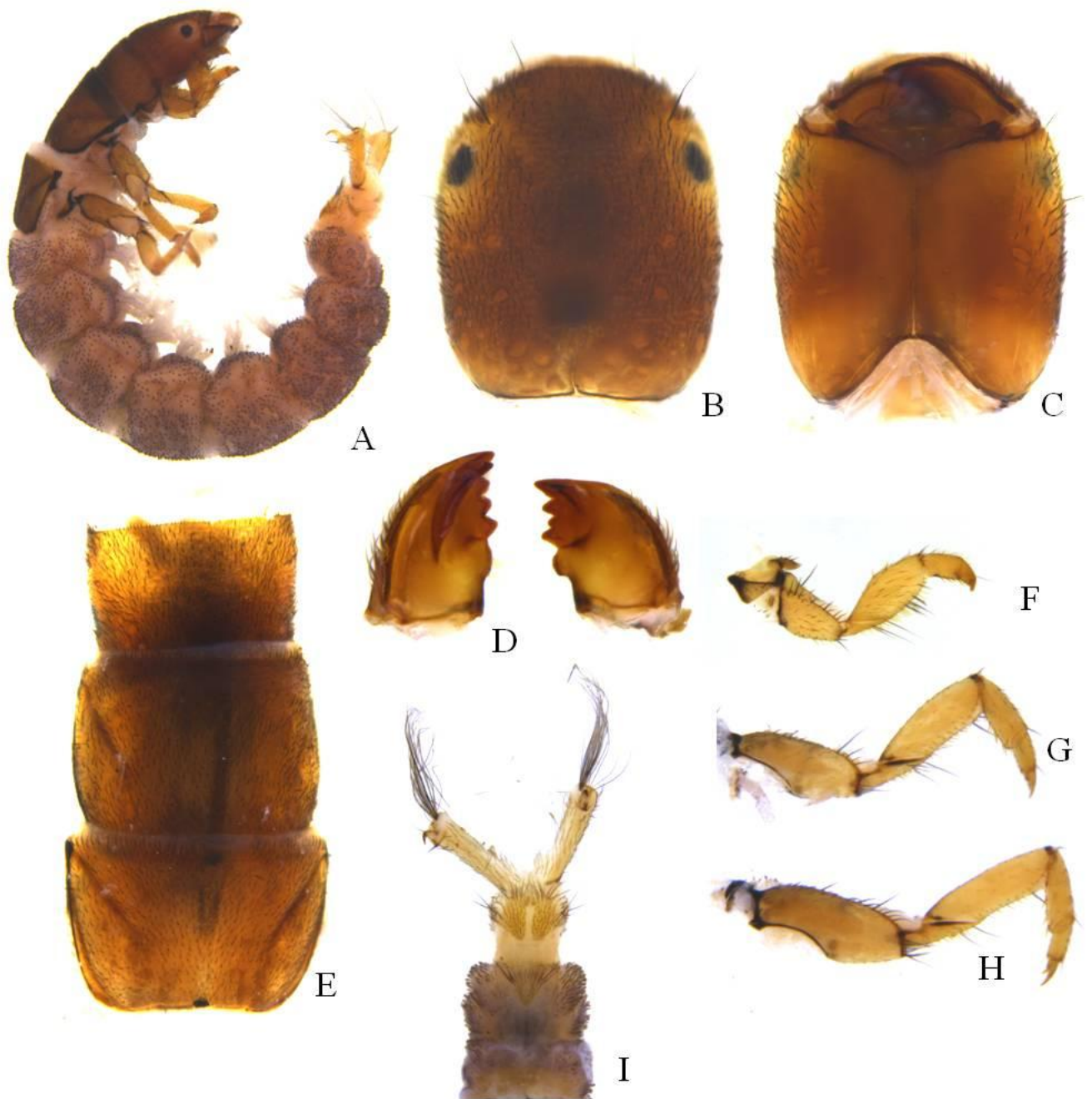


Figura 16. *Smicridea (Smicridea)* sp. 2, larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - noto torácico, vista dorsal; F – – G – Pernas torácicas; I – extremidade posterior do abdome e falsa perna anal, vista ventral;

5.2.3..Gênero *Macronema*

O gênero *Macronema* Pictet, 1836 pertencente à subfamília Macronematinae, tem distribuição restrita à região Neotropical. Os adultos desse gênero são coloridos, geralmente com asas, tórax e cabeça recobertos por pequenas cerdas de coloração verde, amarela e branca. A espécie *Macronema variipenne* Flint e Bueno-Soria 1979, foi a primeira do gênero que teve a larva descrita e associada por Flint e Bueno-Soria (1982), a qual possui os seguintes caracteres diagnósticos: gena lisa sem estridulações, falsas pernas anais longas e delgadas com região mediana dobrável, brânquias abdominais com ramo principal grosso com ramificações muito finas e uniformes, trocantin curto e simples. No Brasil, consta a associação de 8 larvas do gênero *Macronema* (Vidovix, 2013), sendo cinco associadas pelo método molecular e três pelo método de metamorfotipo. No presente trabalho foi possível a associação de mais uma larva, a uma espécie identificada como *Macronema* aff. *immaculatum*.

***Macronema* aff. *immaculatum* Mosely, 1933**

Descrição: Larva (fig. 18A)– Comprimento 12,0-15,0 mm (n = 5)

Cabeça. (fig.18B) Dorsal. Arredondada, coloração marrom-escura com algumas manchas das inserções musculares de cor amarela; Frontoclípeo levemente côncavo. Gena ventral com algumas cerdas diminutas na região anterior; coloração amarela nas laterais e marrom na região mediana; manchas das inserções musculares mais escuras na região póstero-lateral; Mandíbulas, assimétricas (fig. 18D); coloração amarela com a margem interna e o ápice marrom-escuro; Mandíbula esquerda com um dente apicodorsal, pequeno, truncado; Mandíbula direita com um dente apicodorsal, dentes subapicais fusionados e de formato côncavo, um dente molar obtuso. Tórax: Notos torácicos esclerosados (fig. 18E). Pronoto dividido por linha ecdisial longitudinal. Mesonoto maior que o metanoto e apresentando sulcos oblíquos ondulados. **Lateral.** Pernas torácicas amarelo-claras, sem modificações; perna anterior fêmur com cerdas; trocantin, curto, cônico, com cerdas. Pernas medianas e posteriores com coxa mais larga que o fêmur e duas vezes o tamanho da coxa. **Torax.** Notos torácicos esclerosados (Fig. 18D), cobertos por cerdas finas e curtas. Pronoto dividido por linha ecdisial

longitudinal. Mesonoto e metanoto inteiros; **Lateral.** (Figs. 18F-I) Primeiro par de pernas com várias cerdas curtas. Trocântim triangular, curto, pontigudo. **Abdômen.** Segmentos I a IV apresentando brânquias com dois filamentos com um ramo principal Nos segmentos V a VII, brânquias com dois ramos principais e filamentos finos e curtos. Brânquias laterais ausentes. Esterno IX com dois escleritos subtriangulares pequenos e pouco esclerosados com cerdas curtas na região anteromediana e cerdas longas na margem posterolateral (Fig.18H), esclerito lateral ausente. Segmento X com par de falsas pernas anais longas com garra simples e cerdas longas.

Nota. *Macronema* aff. *immaculatum* possui cabeça de coloração marrom-escura e apresenta uma mancha amarelada, de forma retangular na região mediana do frontoclípeo. A larva de *Macronema pennyi*, mostra essa mancha amarelada na cabeça, mas são mais amareladas do que as da larva *Macronema* aff. *immaculatum*. A cabeça também tem formato diferente nas duas espécies, sendo mais larga e arredondada em *M.* aff. *immaculatum* que em *M. pennyi*.

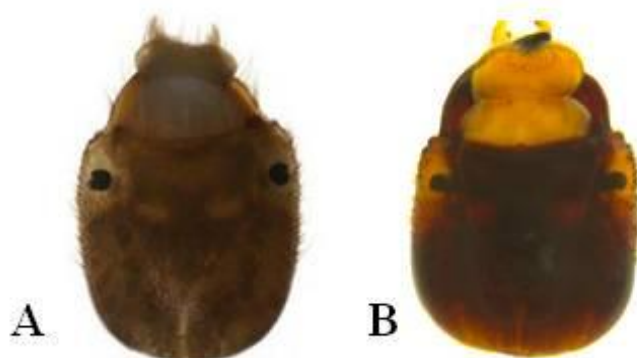


Figura 19. A – *Macronema pennyi*, cabeça em vista dorsal (imagem retirada de Vidovix, 2013). B – *Macronema* aff. *immaculatum*, cabeça em vista dorsal.

Biologia. As larvas foram coletadas em substrato rochoso em trechos de correnteza, sendo encontradas em diferentes altitudes (desde 347 m a 1583 m).

Material examinado. — **BRASIL: Rio de Janeiro:** Guapimirim. Rio Soberbo, represa final do parque, S22°29'45,5" W42°59'49,7", 347 m, 2 larvas, 29.ix-02.x.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A. Alves e A.L.R. Silva col.; Teresópolis. Cachoeira Veu a Noiva, afluyente Rio Beija-flor S22°26'54,4" W43°0'48,3", 1583 m, 2 larvas, 26-

29.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão col.; Afluente do Rio Paquequer, estrada, S22°27'18,76" W42°59'56,9", 1142 m, 1 larva, 29.i-01.ii.2016, A.P.M. Santos, K.A. Estevão, A.A. Alves e A.L.R. Silva col.

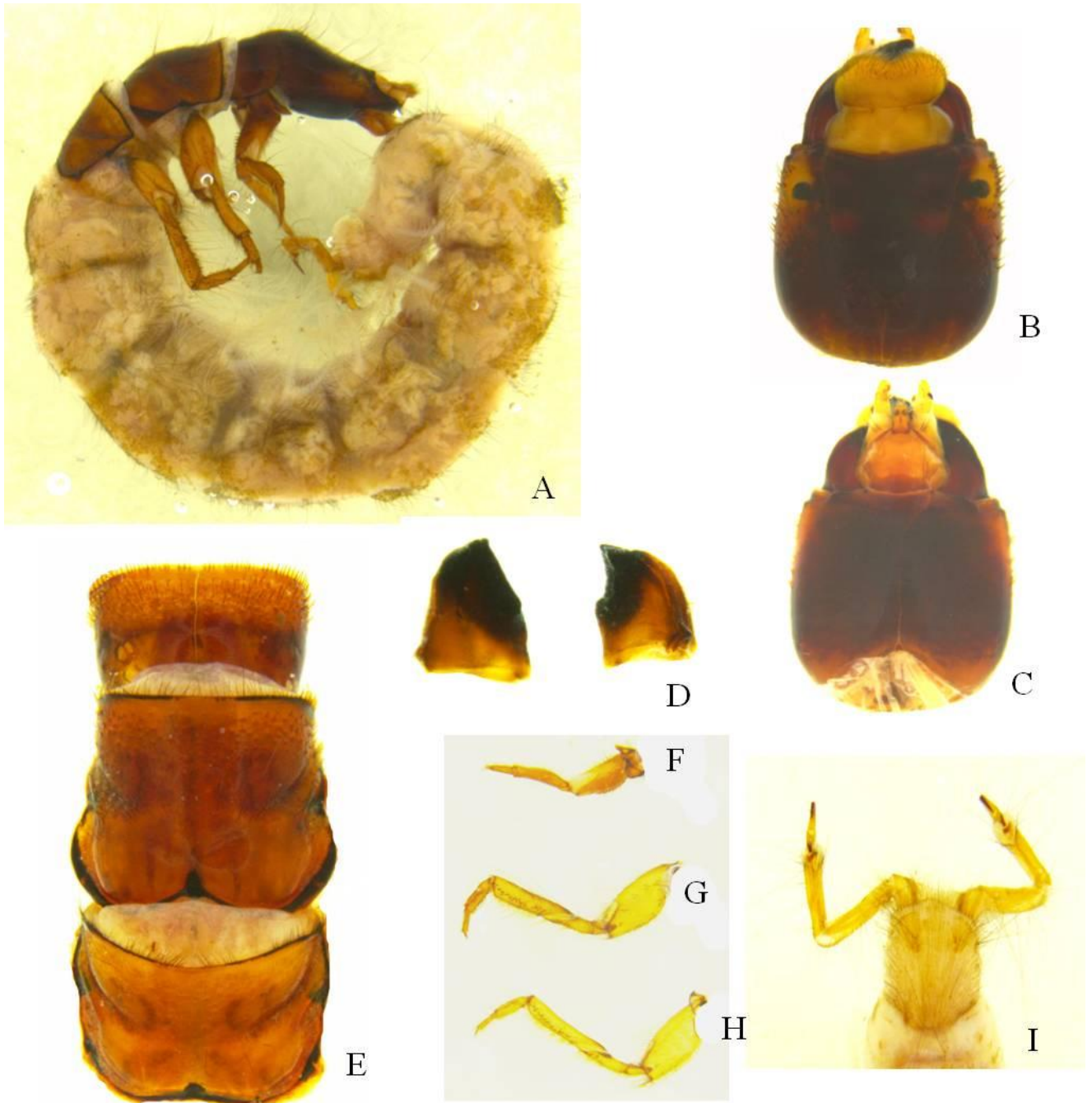


Figura 18. *Macronema aff. immaculatum* Mosely, 1933 larva. A – hábito, vista lateral; B – cabeça, vista dorsal; C – cabeça, vista ventral; D – mandíbulas, vista dorsal; E - notos torácicos, vista dorsal; I – Segmentos abdominais VIII e IX e falsa perna anal;

5.2.4. Caracteres importantes das larvas

A maioria das larvas difere principalmente pelo formato da cabeça, padrão de manchas e coloração da cabeça, posição e forma dos sulcos estridulatórios, coxa da perna anterior e o número de brânquias abdominais ventrais. Uma característica

observada nas larvas que foram associadas é o formato das mandíbulas e os dentes, o qual foi uma importante característica para diferenciar as larvas das espécies. As larvas de *S. (R.) froehlichii* associada e descrita por Gomes, 2016 (fig. 20) e as larvas associadas para a mesma espécie no presente trabalho, embora tenham variações de coloração, as mandíbulas são muito similares. Para as demais larvas, cada espécie apresentou características diferentes no que se refere à mandíbula.

Para o gênero *Macronema* a mandíbula de *Macronema* aff. *immaculatum*, larva associada no trabalho foi comparada com as larvas associadas no trabalho Vidovix, 2013 (fig. 20). Apesar de serem muito similares é possível identificar a espécie pela mandíbula.

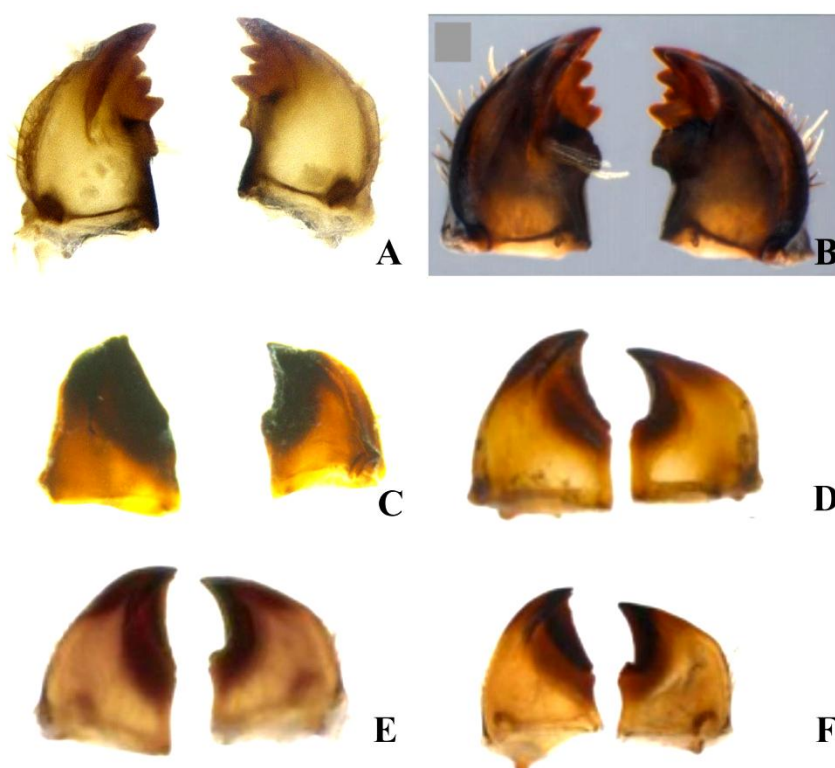


Figura 20. Imagem comparativa das Mandíbulas. *Smicridea froehlichii* – A- Presente trabalho; B – imagem extraída do trabalho Gomes (2016); *Macronema*, C – *Macronema* aff. *immaculatum*; D – *Macronema exophthalmum*; E- *Macronema fragile*; F- *Macronema hageni*. (imagens D - F extraídas de Vidovix (2013).

Conclusão

- 1) No presente trabalho, o fragmento do DNA barcode se mostrou eficaz para a associação de larvas e adultos de espécies da família Hydropsychidae.
- 2) Utilizando esse método, foi possível a associação de larvas de cinco espécies pela primeira vez: *Leptonema ferelunatum* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Leptonema pallidum* Gérin, 1834; *Leptonema santosi* Jardim, Dumas & Nessimian, 2010; *Smicridea (Rhyacophylax) ralphi*, Almeida & Flint, 2002; *Macronema aff. immaculatum*, Mosely.
- 3) A associação de *Smicridea (Rhyacophylax) froehlichii* Almeida & Flint, 2002, feita por Gomes (2016) que utilizou o método de metamorfótipo, foi corroborada pela associação molecular. Contudo, nas larvas associadas aqui foram observadas pequenas variações nas características morfológicas, provavelmente associadas às diferentes localidades de coleta das larvas.
- 4) Dentre os caracteres morfológicos identificados, a forma da mandíbula mostrou-se bastante útil na distinção das larvas em nível específico.

Referências

ANGRISANO, E.B. 1995. Insecta Trichoptera. *In* Lopretto, E.C. & Tell, G. (Ed.) **Ecosistemas de aguas continentales, metodología para su estudio, Tomo III**. La Plata: Ediciones Sur, pp. 1199-1237.

ANGRISANO, E.B. 1998. Trichoptera. *In*: Morrone, J.J.; Coscarón, S. (Eds). *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos: una Perspectiva Biotaxonomica*. Ediciones Sur, La Plata, Argentina. p. 374-384.

CALOR, A.R. 2009. Considerações Acerca da Filogenia de Trichoptera Kirby 1813: da Análise dos Dados para as Hipóteses ou dos Cenários para os Dados. *EntomoBrasilis*, 2(1): 01–10. C

CURTIS, J. 1835. **British Entomology**, vol. XII, Richard Taylor, London, pp. 530-577.

DUMAS, L.L. & NESSIMIAN, J.L. 2009. A new species of *Leptonema* Guérin (Trichoptera: Hydropsychidae) from southeastern Brazil. **Zootaxa**, **2245**: 65- 68.

DEAN, W. **A ferro e fogo – a história da devastação da Mata Atlântica brasileira**. São Paulo: Cia. dasLetras, 1996.

ESKOV, K.Y. & SUKATCHEVA, I.D. 1997. Geographical distribution of the Paleozoic and Mesozoic caddisflies (Insecta: Trichoptera). Proceedings of the 8th International Symposium on Trichoptera.

FUNDAÇÃO INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL DO RIO DE JANEIRO – FIDERJ. 1978. **Indicadores climatológicos do estado do Rio de Janeiro**. 156 p.

FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology & Biotechnology**, **3**: 294- 297.

GERACI, C.J., ZHOU, X., MORSE, J.C. & KJER, K.M. 2010. Defining the genus *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) based on DNA and morphological evidence. **Journal of the North American Benthological Society**, **29**(3):918-933.

GOMES, G. R.D. *Smicridea* McLachlan, 1871 (Trichoptera: Hydropsychidae: Smicrideinae) do Brasil: Associação de larvas e adultos usando sequências de DNA mitocondrial e metamorfótipo. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 139pp.

GRIMALDI, D. & ENGEL, M.S. 2005. **Evolution of the Insects**. Cambridge: Cambridge University Press. xv + 755 pp. G

HOLZENTHAL, R.W., BLAHNIK, R.J., KJER, K.M. & PRATHER, A.P. 2007a. An update on the phylogeny of caddisflies (Trichoptera). *In: Proceedings of the XIIth International Symposium on Trichoptera*, Bueno-Soria, J., BarbaAlvarez, R. & Armitage, B. (Eds.). The Caddis Press, Columbus, Ohio, pp. 143-153.

HOLZENTHAL, R.W., BLAHNIK, R.J., PRATHER, A.P & KJER, K.M. 2007b. Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies. **Zootaxa**, **1668**: 639-698.

HOLZENTHAL RW AND CALOR AR. 2017. Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). **ZooKeys** **654**: 1-566.

HUAMANTINCO, A.A.; NESSIMIAN, J.L. 1999. Estrutura e distribuição espacial da comunidade de larvas de Trichoptera (Insecta) em um tributário de primeira ordem do Rio Paquequer, Teresópolis, RJ. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11: 1-16.

IVANOV, V.D.; MELNITSKY, S.I. 2002. Structure of pheromone glands in Trichoptera. *Nova Supplementa Entomologica (Proceedings of the 10th International Symposium on Trichoptera)*, 15: 17-28.

JARDIM, G.A., DUMAS, L.L. & NESSIMIAN, J.L. 2010. Three new species of *Leptonema* Guérin (Trichoptera: Hydropsychidae) from southeastern Brazil. **Zootaxa**, **2654**: 52-60.

JARDIM, G. A. 2015. Análise filogenética do gênero *Leptonema* Guérin, 1843 (Trichoptera: Hydropsychidae: Macronematinae). Dissertação de Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 223pp.

KIMURA, M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, **16**: 111-120.

KJER, K. M.; BLAHNIK, R. J. & HOLZENTHAL, R. W. 2001. Phylogeny of Trichoptera (Caddisflies): characterization of signal and noise within multiple datasets. **Systematic Biology**, **50**, 781–816.

KJER, K. M.; BLAHNIK, R. J. & HOLZENTHAL, R. W. 2002. Phylogeny of caddisflies (Insecta, Trichoptera). **Zoologica Scripta** **31**, 83–91

KRISTENSEN, N.P. 1984. Studies on the morphology and systematics of primitive Lepidoptera (Insecta). *Steenstrupia*, **10**: 141-191

MARINONI, L. & ALMEIDA, G.L. 2000. Abundância e sazonalidade das espécies de Hydropsychidae (Insecta, Trichoptera) capturadas em armadilha luminosa no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **17** (1): 283 – 299.

MORSE, J.C. 1997. Phylogeny of Trichoptera. *Annual review of entomology*, **42**: 427-50.

MORSE, J.C. 2003. Trichoptera (caddisflies). *Encyclopedia of Insects*. V. H. Resh & R.T. Cardé. San Diego, Academic Press, 1145-1151 p.

MUÑOZ-QUESADA, F. 1999. El género *Leptonema* (Trichoptera: Hydropsychidae) en Costa Rica, con la descripción de una nueva especie. **Revista de**

Biologia Tropical, 47(4): 959-1006.

MYERS, N; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858.

RIZZINI, C. T. 1979. **Tratado de fitogeografia do Brasil - aspectos sociológicos e florísticos**. São Paulo, Hucitec/Ed. USP, v. 2. 347 p.

NEBOISS, A. 1991. Trichoptera (Caddis-flies, caddises). *In*: C.S.I.R.O. (Ed) *The Insects of Australia*. Cornell University Press, Ithaca, New York, p.787-816.

NESSIMIAN, J.L. & DUMAS, L.L. 2010. Description of the immature stages of *Leptonema tridens* (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae) from southeastern Brazil with notes on its biology. *ZOOLOGIA* 27 (3): 465–471, June, 2010 doi: 10.1590/S1984-46702010000300021

PAPROCKI, H.; HOLZENTHAL, R.W. 2002. A review of the Brazilian genus *Barypenthus* Burmeister (Trichoptera: Odontoceridae). *Nova Supplementa Entomologica*, 15: 223-230.

PES, A.M.O. 2005. Taxonomia , estruturas e riquezas das assembleias de larvas e pupas de Trichoptera (Insecta), em igarapés na Amazônia Central. Tese de Doutorado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

PES, A. M. O.; HAMADA, N. & NESSIMIAN, J. L. 2005. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 49:181–204

PES, A.M.; SANTOS, A.P.M.; BARCELOS-SILVA, P.; CAMARGOS, L.M. 2014. Ordem Trichoptera. *In*: Hamada, N.; Nessimian, J.L.; Querino, R.B. (Eds). *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Editora do INPA, Manaus, Amazonas, 391-433p.

PES A.M.O. & SANTOS A.P.M. 2018. Hydropsychidae in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/14819>>. Acesso em: 08 Ago. 2018

RESH, V. H. & ROSENBERG, D. M. 1984. **The ecology of aquatic insects**. Praeger Publishers, New York, 625 pp.

ROSS, H.H. 1967. The evolution and past dispersal of the Trichoptera. *Annual Review of Entomology* 12: 169-206.

RUITER, D. E.; BOYLE, E. E. & ZHOU, X. 2013. DNA barcoding facilitates associations and diagnoses for Trichoptera larvae of the Churchill (Manitoba, Canada) area. *BMC Ecology* 13:5. 39pp.

SAITOU N.; NEI, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

SANTOS, A. P. M.; TAKYIA, D. M. & NESSIMIAN, J. L. 2016. Integrative taxonomy of *Metrichia* Ross (Trichoptera: Hydroptilidae: Ochrotrichiinae) microcaddisflies from Brazil: descriptions of twenty new species. **PeerJ** 4: e2009. <https://doi.org/10.7717/peerj.2009>.

SCHEFTER, P. W. 1996. Phylogenetic relationships among subfamily groups in the Hydropsychidae (Trichoptera) with diagnoses of the Smicrideinae, new status, and the Hydropsychinae. **Journal of the North American Benthological Society**, 15(4): 615-633.

SIMON, C., FRATI, F., BECHENBACK, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, 87(6):651- 701.

SPRINGER, M.; RAMÍREZ A. & HANSON, P. 2010. Macroinvertebrados de Agua

Dulce de Costa Rica I. **Revista de Biología Tropical** 58 ,Suplemento No. 4 Vol 1, Cap 7, 151-198.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A. & KUMAR S. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30:2725-2729.

VIDOVIX, T.A.S. 2013. Taxonomia de *Macronema* Pictet (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae) e associação de larvas e adultos por meio do metamorfótipo e sequências de DNA do gene COI.). Dissertação de Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 138pp.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Fundação IBGE, 1991.

WEAVER, J.S. & MORSE, J.C. 1986. Evolution of feeding and case-making behavior in Trichoptera. *Journal of North American Benthological Society*, 5(2): 150-158.

WHEELER, W.C.; WHITING, M.F.; WHEELER, Q.D.; CARPENTER, J.M. 2001. The phylogeny of extant insect orders. *Cladistics*, 17: 113-169.

WIGGINS, G. B. 1996. **Larvae of the North American Caddisfly genera (Trichoptera)**. 2nd ed. Toronto (Canada). Univ Toronto Press, Toronto. 457pp

WIGGINS, G.B. & WICHARD W. 1989. Phylogeny of pupation in Trichoptera, with proposals on the origin and higher classification of the order. *Journal of the North American Benthological Society*. 8(3): 260-276.

ZHOU, X.; KJER, K.M.; MORSE, J.C. 2007. Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. **Journal of the North American Benthological Society**, 26: 719-742.

Anexo I - Distância intraespecífica utilizando o modelo K2P das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) entre espécies do gênero *Leptonema* da família Hydropsychidae.

Código/ Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>Leptonema agraphum</i> ENT214																
2. <i>Leptonema amplifurcatum</i> ENT300	0,00781															
3. <i>Leptonema bifurcatodes</i> ENT301	0,03201	0,02381														
4. <i>Leptonema bifurcatodes</i> ENT377	0,03201	0,02381	0,00000													
5. <i>Leptonema ferelunatum</i> ENT1899	0,03180	0,02367	0,01567	0,01567												
6. <i>Leptonema ferelunatum</i> ENT213	0,03180	0,02367	0,01567	0,01567	0,00000											
7. <i>Leptonema pallidum</i> ENT1893	0,04847	0,04007	0,04847	0,04847	0,03201	0,03201										
8. <i>Leptonema santosi</i> ENT215	0,03180	0,04007	0,03180	0,03180	0,03169	0,03169	0,04822									
9. <i>Leptonema serratum</i> ENT259	0,03201	0,02381	0,01575	0,01575	0,01567	0,01567	0,03180	0,03180								
10. <i>Leptonema stigmaticum</i> ENT1079	0,04007	0,03180	0,02367	0,02367	0,02362	0,02362	0,03989	0,03989	0,00780							
11. <i>Leptonema tridens</i> ENT309	0,03989	0,04822	0,05669	0,05669	0,05647	0,05647	0,05647	0,03980	0,03989	0,04807						
12. <i>Leptonema viridianum</i> ENT437	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847					
13. <i>Leptonema viridianum</i> ENT438	0,06502	0,07371	0,08256	0,08256	0,08302	0,08302	0,06531	0,10024	0,08256	0,09115	0,05702	0,00781				
14. <i>Leptonema viridianum</i> ENT439	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847	0,00000	0,00781			
15. <i>Leptonema viridianum</i> ENT440	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847	0,00000	0,00781	0,00000		
16. <i>Leptonema viridianum</i> ENT441	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847	0,00000	0,00781	0,00000	0,00000	
17. <i>Leptonema trispicatum</i> KX143075	0,05744	0,04882	0,02381	0,02381	0,04007	0,04007	0,02367	0,04007	0,02381	0,03180	0,04822	0,06502	0,07371	0,06502	0,06502	0,06502
18. <i>Leptonema trispicatum</i> KX143258	0,04034	0,03201	0,00781	0,00781	0,02367	0,02367	0,04007	0,04007	0,00781	0,01567	0,04822	0,06502	0,07371	0,06502	0,06502	0,06502
19. <i>Leptonema bifurcatum</i> KX142541	0,04034	0,03201	0,00781	0,00781	0,02367	0,02367	0,04007	0,04007	0,02381	0,03180	0,06531	0,06502	0,07371	0,06502	0,06502	0,06502
20. <i>Leptonema lineaticorne</i> KX140753	0,10825	0,09932	0,10825	0,10825	0,09053	0,09053	0,09938	0,10839	0,10825	0,11724	0,13603	0,14614	0,13643	0,14614	0,14614	0,14614
21. <i>Leptonema pallidum</i> KX103282	0,03180	0,02367	0,04847	0,04847	0,03201	0,03201	0,01575	0,04822	0,03180	0,03989	0,03980	0,05669	0,06531	0,05669	0,05669	0,05669
22. <i>Leptonema pallidum</i> KX142237	0,04847	0,04007	0,06571	0,06571	0,04882	0,04882	0,01575	0,06531	0,04847	0,05669	0,05647	0,05669	0,06531	0,05669	0,05669	0,05669
23. <i>Leptonema pallidum</i> KX143219	0,04847	0,04007	0,04847	0,04847	0,03201	0,03201	0,00000	0,04822	0,03180	0,03989	0,05647	0,05669	0,06531	0,05669	0,05669	0,05669
24. <i>Leptonema tridens</i> KX141842	0,04822	0,05669	0,06531	0,06531	0,06502	0,06502	0,06502	0,04807	0,04822	0,05647	0,00781	0,05702	0,06571	0,05702	0,05702	0,05702
25. <i>Leptonema tridens</i> KX144684	0,04822	0,05669	0,06531	0,06531	0,06502	0,06502	0,06502	0,04807	0,04822	0,05647	0,00781	0,05702	0,06571	0,05702	0,05702	0,05702
26. <i>Leptonema viridianum</i> KX142982	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847	0,00000	0,00781	0,00000	0,00000	0,00000
27. <i>Leptonema viridianum</i> KX144409	0,05647	0,06502	0,07371	0,07371	0,07409	0,07409	0,05669	0,09115	0,07371	0,08222	0,04847	0,00000	0,00781	0,00000	0,00000	0,00000
28. <i>Leptonema</i> sp. 1 ENT3620	0,04007	0,03180	0,02367	0,02367	0,00781	0,00781	0,02381	0,03989	0,02367	0,03169	0,06502	0,06531	0,07409	0,06531	0,06531	0,06531
29. <i>Leptonema</i> sp. 1 ENT3621	0,04007	0,03180	0,02367	0,02367	0,00781	0,00781	0,02381	0,03989	0,02367	0,03169	0,06502	0,06531	0,07409	0,06531	0,06531	0,06531
30. <i>Leptonema</i> sp. 1 ENT3622	0,04007	0,03180	0,02367	0,02367	0,00781	0,00781	0,02381	0,03989	0,02367	0,03169	0,06502	0,06531	0,07409	0,06531	0,06531	0,06531
31. <i>Leptonema</i> sp. 2 ENT3623	0,04847	0,04007	0,04847	0,04847	0,03201	0,03201	0,00000	0,04822	0,03180	0,03989	0,05647	0,05669	0,06531	0,05669	0,05669	0,05669
32. <i>Leptonema</i> sp. 1 ENT3641	0,04007	0,03180	0,02367	0,02367	0,00781	0,00781	0,02381	0,03989	0,02367	0,03169	0,06502	0,06531	0,07409	0,06531	0,06531	0,06531
33. <i>Leptonema</i> sp. 2 ENT3975	0,04847	0,04007	0,04847	0,04847	0,03201	0,03201	0,00000	0,04822	0,03180	0,03989	0,05647	0,05669	0,06531	0,05669	0,05669	0,05669
34. <i>Leptonema</i> sp. 3 ENT3976	0,04822	0,05669	0,04822	0,04822	0,04807	0,04807	0,06502	0,01567	0,04822	0,05647	0,05635	0,10901	0,09984	0,10901	0,10901	0,10901

Continuação

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
0,01575																			
0,01575 0,01575																			
0,12660 0,11734 0,11734																			
0,04007 0,04007 0,05702 0,09938																			
0,04007 0,05702 0,05702 0,11756 0,01575																			
0,02367 0,04007 0,04007 0,09938 0,01575 0,01575																			
0,05669 0,05669 0,07409 0,14565 0,04807 0,06502 0,06502																			
0,05669 0,05669 0,07409 0,14565 0,04807 0,06502 0,06502 0,00000																			
0,06502 0,06502 0,06502 0,14614 0,05669 0,05669 0,05669 0,05702 0,05702																			
0,06502 0,06502 0,06502 0,14614 0,05669 0,05669 0,05669 0,05702 0,05702 0,00000																			
0,03180 0,03180 0,01567 0,09938 0,04034 0,04034 0,02381 0,07371 0,07371 0,06531 0,06531																			
0,03180 0,03180 0,01567 0,09938 0,04034 0,04034 0,02381 0,07371 0,07371 0,06531 0,06531 0,00000																			
0,03180 0,03180 0,01567 0,09938 0,04034 0,04034 0,02381 0,07371 0,07371 0,06531 0,06531 0,00000 0,00000																			
0,02367 0,04007 0,04007 0,09938 0,01575 0,01575 0,00000 0,06502 0,06502 0,05669 0,05669 0,02381 0,02381 0,02381																			
0,03180 0,03180 0,01567 0,09938 0,04034 0,04034 0,02381 0,07371 0,07371 0,06531 0,06531 0,00000 0,00000 0,02381																			
0,02367 0,04007 0,04007 0,09938 0,01575 0,01575 0,00000 0,06502 0,06502 0,05669 0,05669 0,02381 0,02381 0,02381 0,00000 0,02381																			
0,05669 0,05669 0,05669 0,10825 0,06502 0,08256 0,06502 0,06482 0,06482 0,10901 0,10901 0,05647 0,05647 0,05647 0,06502 0,05647 0,06502																			

Anexo II - Distância intraespecífica utilizando o modelo K2P das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) entre espécies do gênero *Smicridea* da família Hydropsychidae.

Código/ Espécie	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
<i>S. (R.) vermiculata_HM065502</i>																
<i>S. (S.) albosignata_HM065052</i>	0,06482															
<i>S. (S.) albosignata_HM065054</i>	0,06482	0,00000														
<i>S. (S.) palifera_HM065391</i>	0,05635	0,04034	0,04034													
<i>S. (S.) palifera_HM065392</i>	0,06482	0,04882	0,04882	0,00781												
<i>S. (S.) paranensis_HM065395</i>	0,07345	0,04034	0,04034	0,03201	0,02381											
<i>S. (R.) vermiculata_HM065501</i>	0,00000	0,06482	0,06482	0,05635	0,06482	0,07345										
<i>S. (R.) vermiculata_HM065503</i>	0,00000	0,06482	0,06482	0,05635	0,06482	0,07345	0,00000									
<i>S. (R.) ralphi_KX144016</i>	0,04034	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,04034	0,04034								
<i>S. (R.) jundiai_KX103398</i>	0,03201	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,03201	0,03201	0,04034							
<i>S. (R.) coronata_KX104079</i>	0,05744	0,06482	0,06482	0,09115	0,08222	0,07345	0,05744	0,05744	0,04882	0,02381						
<i>S. (R.) discalis_KX105834</i>	0,05702	0,06474	0,06474	0,06474	0,07328	0,07328	0,05702	0,05702	0,02367	0,06571	0,07456					
<i>S. (R.) spinulosa_KX105978</i>	0,02381	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,02381	0,02381	0,01575	0,04034	0,04882	0,03180				
<i>S. (S.) palifera_KX106454</i>	0,06482	0,04882	0,04882	0,00781	0,01575	0,04034	0,06482	0,06482	0,07345	0,07345	0,10024	0,07328	0,07345			
<i>S. (R.) coronata_KX106703</i>	0,04034	0,08222	0,08222	0,07345	0,06482	0,05635	0,04034	0,04034	0,06621	0,02381	0,03201	0,06571	0,04882	0,08222		
<i>S. (R.) jundiai_KX107063</i>	0,04034	0,04802	0,04802	0,07345	0,06482	0,05635	0,04034	0,04034	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,08222	0,03201	
<i>S. (R.) discalis_KX107132</i>	0,05702	0,06474	0,06474	0,06474	0,07328	0,07328	0,05702	0,05702	0,02367	0,06571	0,07456	0,00000	0,03180	0,07328	0,06571	0,05702
<i>S. (R.) iguazu_KX107272</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,07345	0,08222	0,02381	0,02381	0,01575	0,04034	0,04882	0,04007	0,03201	0,07345	0,06621	0,04882
<i>S. (R.) iguazu_KX107618</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,07345	0,08222	0,02381	0,02381	0,01575	0,04034	0,04882	0,04007	0,03201	0,07345	0,06621	0,04882
<i>S. (S.) albosignata_KX141917</i>	0,07345	0,02381	0,02381	0,04882	0,04034	0,01575	0,07345	0,07345	0,06482	0,04802	0,05635	0,07328	0,06482	0,05744	0,05635	0,05635
<i>S. (R.) ralphi_KX142093</i>	0,04034	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,04034	0,04034	0,00000	0,04034	0,04882	0,02367	0,01575	0,07345	0,06621	0,03201
<i>S. (S.) paranensis_KX142436</i>	0,07345	0,04034	0,04034	0,03201	0,02381	0,00000	0,07345	0,07345	0,08222	0,04802	0,07345	0,07328	0,08222	0,04034	0,05635	0,05635
<i>S. (R.) jundiai_KX142681</i>	0,03201	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,03201	0,03201	0,04034	0,00000	0,02381	0,06571	0,04034	0,07345	0,02381	0,00781
<i>S. (R.) spinulosa_KX142834</i>	0,02381	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,02381	0,02381	0,01575	0,04034	0,04882	0,03180	0,00000	0,07345	0,04882	0,03201
<i>S. (R.) unguiculata_KX142992</i>	0,04034	0,04802	0,04802	0,05635	0,06482	0,07345	0,04034	0,04034	0,03201	0,04034	0,04882	0,03180	0,01575	0,06482	0,04882	0,03201
<i>S. (R.) spinulosa_KX143053</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,07345	0,08222	0,02381	0,02381	0,03201	0,04034	0,04882	0,04847	0,01575	0,07345	0,04882	0,04882
<i>S. (R.) ralphi_KX144435</i>	0,04034	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,04034	0,04034	0,00000	0,04034	0,04882	0,02367	0,01575	0,07345	0,06621	0,03201
<i>S. (R.) froelichi_ENT3772</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (R.) froelichi_ENT3773</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (S.) palifera_ENT3774</i>	0,06482	0,04882	0,04882	0,00781	0,00000	0,02381	0,06482	0,06482	0,07345	0,05635	0,08222	0,07328	0,07345	0,01575	0,06482	0,06482
<i>S. (S.) sp_1_ENT3785</i>	0,06482	0,01575	0,01575	0,04034	0,04882	0,02381	0,06482	0,06482	0,05635	0,05635	0,06482	0,06474	0,05635	0,04882	0,06482	0,06482
<i>S. (R.) sp_3_ENT3794</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (R.) sp_3_ENT3795</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (S.) sp_4_ENT3798</i>	0,05635	0,00781	0,00781	0,03201	0,04034	0,03201	0,05635	0,05635	0,04802	0,04802	0,05635	0,07328	0,04802	0,04034	0,07345	0,05635
<i>S. (R.) sp_5_ENT3800</i>	0,04034	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,04034	0,04034	0,00000	0,04034	0,04882	0,02367	0,01575	0,07345	0,06621	0,03201
<i>S. (R.) sp_3_ENT3801</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (R.) sp_3_ENT3803</i>	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,04802	0,02381	0,02381	0,03201	0,00781	0,03201	0,05702	0,03201	0,07345	0,03201	0,01575
<i>S. (S.) sp_6_ENT3805</i>	0,06482	0,01575	0,01575	0,04034	0,03201	0,02381	0,06482	0,06482	0,05635	0,03982	0,04802	0,08198	0,05635	0,04882	0,06482	0,04802
<i>S. (S.) sp_1_ENT3832</i>	0,06482	0,01575	0,01575	0,04034	0,04882	0,02381	0,06482	0,06482	0,05635	0,05635	0,06482	0,06474	0,05635	0,04882	0,06482	0,06482
<i>S. (S.) sp_2_ENT3833</i>	0,09115	0,04034	0,04034	0,03201	0,02381	0,01575	0,09115	0,09115	0,06482	0,06482	0,07345	0,05633	0,08222	0,04034	0,07345	0,07345
<i>S. (S.) sp_2_ENT3834</i>	0,09115	0,04034	0,04034	0,03201	0,02381	0,01575	0,09115	0,09115	0,06482	0,06482	0,07345	0,05633	0,08222	0,04034	0,07345	0,07345
<i>S. (S.) sp_6_ENT3806</i>	0,06482	0,01575	0,01575	0,04034	0,03201	0,02381	0,06482	0,06482	0,05635	0,03982	0,04802	0,08198	0,05635	0,04882	0,06482	0,04802
<i>S. (R.) sp_2_ENT3979</i>	0,09115	0,04034	0,04034	0,03201	0,02381	0,01575	0,09115	0,09115	0,06482	0,06482	0,07345	0,05633	0,08222	0,04034	0,07345	0,07345
<i>S. (S.) sp_2_ENT3980</i>	0,09984	0,04847	0,04847	0,04007	0,03180	0,02367	0,09984	0,09984	0,07328	0,07328	0,08198	0,06475	0,09083	0,04847	0,08198	0,08198
<i>S. (S.) sp_1_ENT3983</i>	0,06482	0,01575	0,01575	0,04034	0,04882	0,02381	0,06482	0,06482	0,05635	0,05635	0,06482	0,06474	0,05635	0,04882	0,06482	0,06482
<i>S. (R.) sp_5_ENT3799</i>	0,04034	0,03982	0,03982	0,06482	0,07345	0,08222	0,04034	0,04034	0,00000	0,04034	0,04882	0,02367	0,01575	0,07345	0,06621	0,03201

Continuação

51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
0,04007																			
0,04007	0,00000																		
0,07328	0,06482	0,06482																	
0,02367	0,01575	0,01575	0,06482																
0,07328	0,08222	0,08222	0,01575	0,08222															
0,06571	0,04034	0,04034	0,04802	0,04034	0,04802														
0,03180	0,03201	0,03201	0,06482	0,01575	0,08222	0,04034													
0,03180	0,04882	0,04882	0,07345	0,03201	0,07345	0,04034	0,01575												
0,04847	0,03201	0,03201	0,06482	0,03201	0,08222	0,04034	0,01575	0,03201											
0,02367	0,01575	0,01575	0,06482	0,00000	0,08222	0,04034	0,01575	0,03201	0,03201										
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201									
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201	0,00000								
0,07328	0,07345	0,07345	0,04034	0,07345	0,02381	0,05635	0,07345	0,06482	0,07345	0,07345	0,05635	0,05635							
0,06474	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,05635	0,05635	0,05635	0,04882						
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201	0,00000	0,00000	0,05635	0,05635					
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201	0,00000	0,00000	0,05635	0,05635	0,00000				
0,07328	0,04802	0,04802	0,01575	0,04802	0,03201	0,04802	0,04802	0,05635	0,04802	0,04802	0,04802	0,04802	0,04034	0,00781	0,04802	0,04802			
0,02367	0,01575	0,01575	0,06482	0,00000	0,08222	0,04034	0,01575	0,03201	0,03201	0,00000	0,03201	0,03201	0,07345	0,05635	0,03201	0,03201	0,04802		
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201	0,00000	0,00000	0,05635	0,05635	0,00000	0,00000	0,04802	0,03201	
0,05702	0,03201	0,03201	0,04802	0,03201	0,04802	0,00781	0,03201	0,04882	0,03201	0,03201	0,00000	0,00000	0,05635	0,05635	0,00000	0,00000	0,04802	0,03201	0,00000
0,08198	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,02381	0,03982	0,05635	0,06482	0,05635	0,05635	0,03982	0,03982	0,03201	0,01575	0,03982	0,03982	0,00781	0,05635	0,03982
0,06474	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,05635	0,03982	0,03982	0,03201	0,01575	0,03982	0,03982	0,00781	0,05635	0,03982
0,05633	0,06482	0,06482	0,01575	0,06482	0,01575	0,06482	0,08222	0,07345	0,08222	0,06482	0,06482	0,06482	0,02381	0,02381	0,06482	0,06482	0,03201	0,06482	0,06482
0,05633	0,06482	0,06482	0,01575	0,06482	0,01575	0,06482	0,08222	0,07345	0,08222	0,06482	0,06482	0,06482	0,02381	0,02381	0,06482	0,06482	0,03201	0,06482	0,06482
0,08198	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,02381	0,03982	0,05635	0,06482	0,05635	0,05635	0,03982	0,03982	0,03201	0,01575	0,03982	0,03982	0,00781	0,05635	0,03982
0,05633	0,06482	0,06482	0,01575	0,06482	0,01575	0,06482	0,08222	0,07345	0,08222	0,06482	0,06482	0,06482	0,02381	0,02381	0,06482	0,06482	0,03201	0,06482	0,06482
0,06475	0,07328	0,07328	0,02367	0,07328	0,02367	0,07328	0,09083	0,08198	0,09083	0,07328	0,07328	0,07328	0,03180	0,03180	0,07328	0,07328	0,04007	0,07328	0,07328
0,06474	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,02381	0,05635	0,05635	0,06482	0,05635	0,05635	0,05635	0,05635	0,04882	0,00000	0,05635	0,05635	0,00781	0,05635	0,05635
0,02367	0,01575	0,01575	0,06482	0,00000	0,08222	0,04034	0,01575	0,03201	0,03201	0,00000	0,03201	0,03201	0,07345	0,05635	0,03201	0,03201	0,04802	0,00000	0,03201

71	72	73	74	75	76	77	78	79
----	----	----	----	----	----	----	----	----

0,03982								
0,05635	0,01575							
0,06482	0,02381	0,02381						
0,06482	0,02381	0,02381	0,00000					
0,03982	0,00000	0,01575	0,02381	0,02381				
0,06482	0,02381	0,02381	0,00000	0,00000	0,02381			
0,07328	0,03180	0,03180	0,00780	0,00780	0,03180	0,00780		
0,05635	0,01575	0,00000	0,02381	0,02381	0,01575	0,02381	0,03180	
0,03201	0,05635	0,05635	0,06482	0,06482	0,05635	0,06482	0,07328	0,05635

Anexo III - Distância intraespecífica utilizando o modelo K2P das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) entre espécies do gênero *Macronema* da família Hydropsychidae.

Código/ Espécie	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
81. <i>Macrostemum erichson</i> KX294870													
82. <i>Macrostemum hyalinum</i> KX294504	0,04847												
83. <i>Macrostemum hyalinum</i> KX295260	0,03201	0,04847											
84. <i>Macrostemum hyalinum</i> KX295343	0,03201	0,01567	0,03201	0,03201									
85. <i>Macrostemum ulmeri</i> KX143228	0,02381	0,05702	0,02381	0,02381	0,04034								
86. <i>Macrostemum</i> sp. ENT3617	0,02381	0,05702	0,02381	0,02381	0,04034	0,00000							
87. <i>Macrostemum</i> sp. ENT3618	0,02381	0,05702	0,02381	0,02381	0,04034	0,00000	0,00000						
88. <i>Macrostemum</i> sp. ENT3619	0,02381	0,05702	0,02381	0,02381	0,04034	0,00000	0,00000	0,02381	0,02381	0,02381			
89. <i>Macrostemum brasilienses</i> ENT3984	0,03201	0,03180	0,03201	0,03201	0,03201	0,02381	0,02381	0,02381					
90. <i>Macrostemum digramma</i> ENT3990	0,03201	0,03180	0,04882	0,04882	0,03201	0,04034	0,04034	0,04034	0,03201				
91. <i>Macronema</i> sp. ENT3631	0,07409	0,07371	0,08302	0,08302	0,08302	0,07409	0,07409	0,07409	0,08302	0,08302			
92. <i>Macrostemum digramma</i> ENT3987	0,03201	0,03180	0,04882	0,04882	0,03201	0,04034	0,04034	0,04034	0,03201	0,00000	0,08302		
93. <i>Macronema aff. immaculatum</i> ENT3989	0,07409	0,07371	0,08302	0,08302	0,08302	0,07409	0,07409	0,07409	0,08302	0,08302	0,00000	0,08302	
94. <i>Macronema</i> sp. ENT3630	0,07409	0,07371	0,08302	0,08302	0,08302	0,07409	0,07409	0,07409	0,08302	0,08302	0,00000	0,08302	0,00000