UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Zooplanctofagia de heterópteros na estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago neotropical: análise integrada entre DNA do conteúdo alimentar e experimento em mesocosmo”.

Andrés Ricardo Domingos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2018

ANDRÉS RICARDO DOMINGOS

Zooplanctofagia de heterópteros na estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago neotropical: análise integrada entre DNA do conteúdo alimentar e experimento em mesocosmo

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Orientadora: Prof.ª. Dra. Marlene Sofia Arcifa Froehlich

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Domingos, Andrés Ricardo

Zooplanctofagia de heterópteros na estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago neotropical: análise integrada entre DNA do conteúdo alimentar e experimento em mesocosmo. Ribeirão Preto, 2018.

102 p. : il. 24; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Orientadora: Prof.ª. Dra. Marlene Sofia Arcifa Froehlich

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

1. Interações tróficas - 2. Heterópteros - 3. Zooplâncton - 4. Análise molecular - 5. Mesocosmo - 6. PCR - 7. Lago Tropical Raso

Nome: DOMINGOS, Andrés Ricardo

Título: “Zooplanctofagia de heterópteros na estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago neotropical: análise integrada entre DNA do conteúdo alimentar e experimento em mesocosmo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Aprovado em: ____/____/____/

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

RESUMO

DOMINGOS, Andrés Ricardo. *Zooplanctofagia de heterópteros na estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago neotropical: análise integrada entre DNA do conteúdo alimentar e experimento em mesocosmo.* 2018. 103 p. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Alguns estudos mostraram que heterópteros aquáticos podem influenciar a estrutura de comunidades zooplanctônicas. No entanto, parte destes estudos foram realizados em experimentos de laboratório que não são capazes de simular totalmente a estrutura do ecossistema. Para confrontar este problema, técnicas moleculares juntamente com experimentos *in situ* podem ser adotados. A técnica molecular baseia-se na detecção de DNA das presas (biomarcadores) no tubo digestório dos predadores. O objetivo deste trabalho foi analisar o conteúdo estomacal dos heterópteros *Martarega uruguayensis* e *Rheumatobates crassifemur* visando avaliar a hipótese da presença de presas zooplanctônicas por meio de vestígios de DNA , bem como avaliar a existência do efeito da predação dos notonectídeos sobre a densidade populacional das presas no ambiente. Para atender aos objetivos propostos, o trabalho foi dividido em 3 capítulos: O **capítulo I** descreve como foram escolhidos os biomarcadores moleculares das presas e o desenvolvimento dos primers necessários para conduzir as análises. Os primers específicos são de regiões internas do gene COI das presas zooplanctônicas. Foram testadas suas especificidades e sensibilidade por meio de reações de PCR. Em testes de especificidade, todos os primers amplificaram com êxito o biomarcador das presas-alvo, sendo incapazes de amplificar o biomarcador de qualquer outra espécie testada. Em testes de sensibilidade, os primers amplificaram com sucesso os biomarcadores das presas zooplanctônicas mesmo em baixas concentrações de DNA, assim como diretamente do trato digestório dos predadores; **O capítulo II** aborda aspectos da dieta dos predadores a partir da frequência de biomarcadores das presas encontrados nos tubos digestório dos insetos coletados no lago. Por meio de 48 reações de PCR com os primers específicos das presas-alvo foram analisados 240 tubos digestórios dos predadores. As presas com maior eletividade foram *S. serrulatus* e *D. gessneri,* e a menor foi *D.* cf. *brevireme*, apesar da alta abundância no ambiente. Tanto para gerrídeos quanto para notonectídeos há uma seletividade acentuada por espécies de presas de maior tamanho, mesmo que em menor frequência relativa no ambiente quando comparadas a outras espécies. Acredita-se que a preferência por presas maiores esteja relacionada à maior facilidade para detecção e

manipulação do predador. A frequências de biomarcadores nos tubos digestórios de *M. uruguayensis* foi maior no período com maior disponibilidade de presas; **O capítulo III** avaliou, o efeito do predador *M. uruguayensis* (Notonectidae) sobre as densidades das populações de presas zooplanctônicas a partir de experimento em mesocosmo. No geral, não houve influência significativa dos predadores sobre nenhuma espécie nos dois primeiros dias. O efeito da predação sobre copepoditos e náuplios foi mais acentuados entre os dias 3 e 4, enquanto que para copépodos adultos foi nos dias 2 e 3. Já para os cladóceros o efeito foi mais acentuado nos dias 4 a 6, exceto para *D.* cf. *brevireme* que não teve efeito da predação em nenhum dia. Aspectos relacionados ao tamanho corporal, densidade populacional das presas, capacidade de evasão e diminuição da sobreposição entre predador e presa são fatores fundamentas no padrão de seletividade e da preferência alimentar de notonectídeos.

Palavras-chave: Interações tróficas; heterópteros; zooplâncton; análise molecular; mesocosmo; PCR; lago tropical raso.

ABSTRACT

DOMINGOS, Andrés Ricardo. *Zooplanktivory of heteroptera upon zooplankton community structure in a neotropical lake: integrated analysis between DNA of feed content and experiment in mesocosm.* 2018. 102 p. Thesis (Doctorate in Comparative Biology) - Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

A few studies have shown that aquatic heteroptera can influence the structure of zooplanktonic communities. However, some of these studies have been conducted in laboratory experiments that are not able to fully simulate the structure of the ecosystem. To confront this problem, a molecular approach along with *in situ* experiment can be adopted. Molecular approach is based on the detection of prey DNA (biomarkers) in the digestive tract of predators. The objective of this work was to analyze the gut contents of the heteropterans *Martarega uruguayensis* and *Rheumatobates crassifemur* to test the hypothesis that will be found traces of zooplankton prey DNA, as well as the effect of the notonectid predation on population density of prey in the environment. To meet the proposed objectives, the work was divided in 3 chapters: **Chapter I** describes how the molecular biomarkers of prey were chosen and the development of the primers needed to conduct the analyses. The specific primers are from internal regions of the COI gene of zooplanktonic prey. Their specificities and sensibility were tested by means of PCR reactions. In specificity tests, all primers successfully amplified the target prey biomarker and were unable to amplify biomarker of any other species tested. In sensitivity tests, the primers successfully amplified the biomarkers of zooplankton prey even at low DNA concentrations, as well as directly from the digestive tract of predators; **Chapter II** addresses aspects of the predators' diet using the frequency of biomarkers of prey found in the digestive tubes of the insects. By means of 48 PCR reactions, with the specific primers from target prey, were analyzed 240 digestive tracts of predators. The prey with greater electivity were *S. serrulatus* and *D. gessneri*, and the smaller one was *D.* cf. *brevireme*, despite the high abundance in the environment. For both gerrids and notonectids, there was a marked selectivity for larger size prey, even though at a lower relative frequency in the environment when compared to other species. This suggests that the preference for larger prey is related to the greater facility for detection and manipulation by the predator. The frequencies of biomarkers in the digestive tracts of *M. uruguayensis* were higher in the period with higher prey availability; **Chapter III** evaluated the effect of the predator *M. uruguayensis* on the densities of zooplankton prey populations from experiment in mesocosm. In general, there was no significant influence of predators on any species in the

first two days. The effect of predation on copepodites and nauplii were more pronounced between days 3 and 4, whereas for adult copepods on days 2 and 3. The effect on cladocerans was more pronounced on days 4 to 6, except for *D.* cf. *brevireme* that was not preyed on. Aspects related to body size, population density of the prey, evasion capacity and decrease overlap between predator and prey are fundamental in the pattern of selectivity and feeding preference of notonectids.

Keywords: Trophic interactions; heteropterans; zooplankton; molecular analysis; mesocosm; PCR; tropical shallow lake.

LISTA DE FIGURAS

1 Introdução Geral

Figura 1.1 - Imagem aérea do hábitat das presas e predadores.

Figura 1.2 - Espécies de presas selecionadas: (1) *Simocephalus serrulatus*, (2) *Daphnia gessneri,* (3) *Ceriodaphnia richardi,* (4) *Diaphanosoma* cf. *brevireme*, (5) *Thermocyclops decipiens* e (6) *Mesocyclops* sp.

Figura 1.3 – Predadores heterópteros mais comuns no Lago Monte Alegre: (1) *Martarega uruguayensis* (Notonectidae) e (2) *Rheumatobates crassifemur* (Gerridae).

2 Capítulo I

Figura 2.1 - Passos para o desenvolvimento e testes dos primers específicos (com base em Sheppard e Harwood, 2005).

Figura 2.2 - Testes da especificidade dos primers amplificando por PCR os biomarcadores das espécies. Foto com as bandas visualizadas em gel agarose. Linha 1 marcador (500 pb); Linha 2 (Dg) – *D. gessneri;* Linha 3 (Cr) - *C. richardi;* Linha 4 (Td) - *T. decipiens;* Linha 5 (Ms) - *Mesocyclops* sp.*;* Linha 6 (Db) - *D.* cf. *brevireme;* Linha 7 (Ss) - *S. serrulatus;* Linha 8 (Rc) – *R. crassifemur;* Linha 9 (Mu) - *M. uruguayensis;* Linha 10 (Blanc) - *Controle negativo.*

Figura 2.3 - Testes dos primers com amostras de DNA misturadas amplificadas por PCR e visualizadas em gel agarose. Linha 1 marcador (500 pb); Linha 2 - *S. serrulatus* (248 pb); Linha 3 - *D. gessneri* (177 pb); Linha 4 -*Mesocyclops* sp. (237 pb); Linha 5 - *T. decipiens* (210 pb); Linha 6 - *C. richardi* (170 pb) e Linha 7 - *D.* cf. *brevireme* (282 pb).

Figura 2.4 - Teste de eficiência dos primers para amplificar em reações de PCR biomarcadores das espécies de presas em diferentes concentrações de DNA. Foto com as bandas visualizadas em gel agarose. Linha 1 marcador (500 pb); Linha 2 - 0.1 ng μL^{-1} de DNA; Linha 3 - 0.5 ng μL^{-1} de DNA; Linha 4 - 1.0 ng μL^{-1} de DNA; Linha 5 - 2.5 ng μL^{-1} de DNA; Linha 6 - 5.0 ng μL^{-1} de DNA; Linha 7 - 10.0 ng μL^{-1} de DNA; Linha 8 – Branco (Controle Negativo).

Figura 2.5 - Eletroforese em gel de agarose para testar se os primers amplificam por PCR os biomarcadores de *D. gessneri* e *C. richardi* presentes nos tubos digestórios de *M. uruguayensis* em cativeiro. Linha 1 - marcador (500 pb); Linha 2 - predador sem alimento; Linha 3 - predador alimentado; Linha 4 (blanc) – Controle negativo.

3 Capítulo II

Figura 3.1 - Fotografias dos géis de agarose com os exemplos dos padrões das bandas positivas das PCR. Linha 1: marcador (500 pb); Linhas 2 a 6: extrações do tubo digestório de 5 indivíduos da mesma espécie; Linha 7: Controle positivo; Linha 8: Controle negativo. (+): biomarcador da presa amplificado; (-): biomarcador da presa não amplificado.

.

Figura 3.2A - Alinhamento com a sequência do gene COI de *T. decipiens* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.2B - Alinhamento com a sequência do gene COI de *C. richardi* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.2C - Alinhamento com a sequência do gene COI de *Mesocyclops* sp. e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.2D - Alinhamento com a sequência do gene COI de *D. gessneri* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.2E - Alinhamento com a sequência do gene COI de *S. serrulatus* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.2F - Alinhamento com a sequência do gene COI de *D.* cf. *brevireme* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

Figura 3.3 - Índices de eletividade relativa (E_i) dos predadores *M. uruguayensis* e *R. crassifemur* jovens e adultos em relação às presas e aos períodos de coleta.

Figura 3.4 - Regressão linear do índice de eletividade relativa em função do tamanho médio das presas zooplanctônicas.

4 Capítulo III

Figura 4.1 - Unidades do mesocosmo ancorados na zona litorânea com aproximadamente 1m de profundidade.

Figura 4.2 - Densidade (média ± EP) de *D. gessneri* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.

Figura 4.3 - Densidade (média ± EP) de *C. richardi* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.

Figura 4.4 - Densidade (média ± EP) de *D.* cf. *brevireme* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.

Figura 4.5 - Densidade (média ± EP) de náuplios nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.

Figura 4.6 - Densidade (média ± EP) de copepoditos nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA durante as coletas nos dias 0 – 6.

Figura 4.7 - Densidade (média ± EP) de copépodos adultos nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.

LISTA DE TABELAS

2 Capítulo I

Tabela 2.1 - Lista dos primers desenvolvidos. Fw: “forward”; Rv: “reverse”.

3 Capítulo II

Tabela 3.1 - Número de espécimes de predadores selecionados para reações de PCR com extrações dos tubos digestórios para detectar biomarcadores das presas a partir de seus primers específicos.

Tabela 3.2 - Comparação das médias ± EP (ind/L) das densidades populacionais das espécies de presas coletadas no ambiente natural nos períodos de abril e agosto de 2015. Teste T-student ($p < 0,05$).

Tabela 3.3 - Proporção de PCR positivos (+) e negativos (-) em relação ao estádio de desenvolvimento do predador e aos períodos de coleta.

Tabela 3.4 - Proporção de PCRs positivos (+) e negativos (+) dos tubos digestórios dos predadores em relação às presas e períodos de coleta. Dg: *D. gessneri*; Cr: *C. richardi*; Db: *D.* cf. *brevireme*; Ss: *S. serrulatus*; Ms: *Mesocyclops* sp. e Td: *T. decipiens.*

Tabela 3.5 -Valores de abundância relativa das espécies de presas no ambiente e no tubo digestório dos predadores nos períodos de abril e agosto de 2015.

4 Capítulo III

Tabela 4.1 - Valores mínimos, máximos e médios de densidades (ind./10 L) dos grupos zooplanctônicos, e a frequência relativa de cada espécie (%) nas amostras de 10 L coletadas no mesocosmo.

Tabela 4.2 - Análise de variância (Anova, $p < 0,05$) para o efeito dos tratamentos (PJ, PA e C), e do tempo (dias de coleta 0 a 6) sobre as densidades (ind./10 L) das presas zooplanctônicas.

Tabela 4.3 - Valores de p em relação à comparação das médias gerais nos 6 dias de coleta entre os tratamentos C-PJ e C-PA (Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 4.4 - Valores de p em relação à comparação das médias em cada um dos 6 dias de coleta entre os tratamentos C-PJ e C-PA (Tukey, $p < 0,05$).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 13
1.1 Objetivos gerais 16
1.2 Área de estudo 16
REFERÊNCIAS 19

2 CAPTÍTULO I - GUIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS DE PCR ESPECÍFICOS DE ESPÉCIE: ESTUDO DE CASO BASEADO NA DETECÇÃO DO DNA DE MICROCRUSTÁCEOS NO TUBO DIGESTÓRIO DE HETERÓPTEROS AQUÁTICOS 22
RESUMO 22
ABSTRACT 23
2.1 Introdução 24
2.2 Material e métodos 27
2.2.1 ***Área de estudo*** 27
2.2.2 ***Coleta das espécies*** 27
2.2.3 ***Extração do DNA (Passo 1)*** 28
2.2.4 ***PCR, purificação e sequenciamento (passos 2 a 4)*** 29
2.2.5 ***Edição e "barcoding" (passo 5)*** 30
2.2.6 ***Desenvolvimento dos primers das presas-alvo (passo 6)*** 30
2.2.7 ***Testes da especificidade dos primers e a eficiência da amplificação em diferentes concentrações de DNA (passo 7)*** 30
2.2.8 ***Teste com predadores em cativeiro*** 31
2.3 Resultados 32
2.3.1 ***"Barcoding" das espécies*** 32
2.3.2 ***Desenvolvimento dos primers das presas-alvo*** 33
2.3.3 ***Testes da especificidade dos primers e a eficiência da amplificação em diferentes concentrações de DNA*** 34
2.3.4 ***Teste com predadores em cativeiro*** 37
2.4 Discussão 37
REFERÊNCIAS 40

3 CAPÍTULO II - ANÁLISE DA PREDAÇÃO DE *Rheumatobates crassifemur* E *Martarega uruguayensis* POR MEIO DA DETECÇÃO DE DNA DE MICROCRUSTÁCEOS NO TUBO DIGESTÓRIO DOS PREDADORES 46

RESUMO 46

ABSTRACT 47

3.1 Introdução 48

3.2 Material e métodos 50

3.2.1 *Coleta, extração de DNA, amplificação e sequenciamento* 50

3.2.2 *Análise dos dados* 52

3.3 Resultados 53

3.4 Discussão 64

REFERÊNCIAS 70

4 CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PREDAÇÃO *IN SITU* DE *Martarega uruguayensis* SOBRE MICROCRUSTÁCEOS COM EXPERIMENTO EM MESOCOSMO 76

RESUMO 76

ABSTRACT 77

4.1 Introdução 78

4.2 Material e métodos 80

4.2.1 *Área de estudo* 80

4.2.2 *Coleta dos predadores* 80

4.2.3 *Desenho e montagem dos experimentos in situ* 81

4.3 Resultados 83

4.4 Discussão 92

REFERÊNCIAS 96

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 101

1 INTRODUÇÃO GERAL

As interações tróficas em uma comunidade biológica são elementos fundamentais que definem a estrutura de um ecossistema, influenciando processos ecológicos como particionamento de nichos e competição interespecífica (Roughgarden 1983; Amarasekare 2008). Muitos estudos têm como meta a compreensão dos efeitos dessas interações na comunidade, que podem variar dependendo dos predadores presentes no ambiente, do nível trófico ocupado por eles, e da dieta específica (Belgrano 2005). Determinar a dieta específica de predadores diretamente no ambiente natural é altamente complexo, visto que a densidade e diversidade de presas disponíveis estão constantemente mudando ao longo do tempo e do espaço. Assim sendo, o que um predador consome depende do que está disponível e acessível a ele (quantitativa e qualitativamente). Em relação aos predadores generalistas, esta informação é um desafio ainda maior e tem sido um dos grandes desafios dos estudos de cadeias tróficas.

Acredita-se que a maioria dos hemípteros aquáticos é predador generalista (Merritt et al. 2008) (*e.g.* heterópteros das famílias Gerridae e Notonectidae). A subordem Heteroptera tem sido dividida em várias infraordens, incluindo Nepomorpha, com espécies verdadeiramente aquáticas que vivem na coluna d'água, na qual se encontra a família Notonectidae; e também a infraordem Gerromorpha, que inclui a família Gerridae, com espécies semi-aquáticas que vivem no ambiente aquático, mas na camada de tensão superficial da água. Possuem estruturas bucais de penetração e sucção, que os tornam capazes de digerirem presas por meio de enzimas injetadas através dessa estrutura (digestão extra-oral). Dessa forma, as presas tornam-se liquefeitas, o que facilita a ingestão dos seus tecidos (Cohen 1995). Sendo assim, devido ao modo alimentar dos heterópteros, torna-se praticamente impossível identificar a composição de sua dieta no ambiente natural, tendo como base a análise visual do conteúdo do tubo digestório desses predadores.

Os notonectídeos habitam a coluna d'água, sendo muito comuns em ecossistemas aquáticos. Têm uma dieta extremamente ampla, alimentando-se de organismos planctônicos, como cladóceros, copépodos e rotíferos, assim como insetos aquáticos e terrestres (Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Blaustein et al. 1995; Blaustein 1998; Gilbert e Burns 1999; Hampton et al. 2000; Hampton e Gilbert 2001). No ambiente aquático, associam-se principalmente às regiões litorâneas (Bennett e Streams 1986; Bailey 1987; Domingos e Arcifa 2017a). Vários estudos demonstraram que eles são capazes de influenciar significativamente a estrutura e a diversidade de espécies de comunidades zooplanctônicas

(Blaustein et al. 1995; Arner et al. 1998; Blaustein 1998; Hampton et al. 2000; Eitam e Blaustein 2010). Contudo, um fator importante a se considerar, é que muitos desses estudos que avaliaram a predação de heterópteros sobre espécies zooplanctônicas, foram realizados em laboratório (Scott e Murdoch 1983; Blaustein 1998; Gilbert e Burns 1999; Hampton e Gilbert 2001; Domingos e Arcifa 2017a) e recipientes a céu aberto (Blaustein et al. 1995; Blaustein 1998; Arner et al. 1998; Eitam e Blaustein 2010).

Os gerrídeos, diferentemente dos notonectídeos, habitam especificamente a película superficial da água e são extremamente adaptados para a vida nesse ambiente, especialmente no que diz respeito à locomoção, alimentação, comportamento reprodutivo e história de vida (Andersen 1982). São predadores oportunistas e, embora algumas espécies se alimentem de detritos, a maioria consome insetos e outros artrópodes que estejam na película de tensão superficial da água (Spence e Andersen 1994). Os menores estádios tendem a concentrar-se em hábitats com vegetação densa e os maiores são geralmente encontrados em vegetação mais aberta (Nummelin et al. 1984; Wheelwright e Wilkinson 1985). Até onde se sabe, o cenário vigente é quase que de inexistência de estudos que abordaram a predação de gerrídeos sobre espécies zooplanctônicas, exceto Domingos e Arcifa (2017b), que demonstraram em experimentos em laboratório a capacidade de predar espécies zooplanctônicas que eventualmente alcancem o estrato superficial da água.

É importante enfatizar que experimentos em laboratório não são capazes de simular totalmente a estrutura real de um ecossistema. Sendo assim, mesmo com o arcabouço desses trabalhos, há uma questão que surge: no ambiente natural, com todos os componentes do ecossistema presentes, inclusive toda gama de presas alternativas às presas zooplanctônicas, além da presença de refúgios para presas, esses dois grupos de heterópteros se alimentam de espécies zooplanctônicas? Essa questão pode ser justificada pelo fato de um predador generalista consumir o que está disponível e acessível a ele no ambiente, que por sua vez, depende da disponibilidade, assim como facilidade com que a presa é detectada e consumida. Considerando que a maior parte dos trabalhos citados testaram a predação em condições experimentais simplificadas, sem grande diversidade de presas e micro-hábitat, e por serem predadores generalistas, é esperado que nestas condições experimentais ocorra a predação. Contudo, no ambiente natural essa questão ainda deve ser elucidada, de forma que seja avaliada a dieta do predador diretamente no seu hábitat, com a menor interferência possível.

Nesse contexto, a análise e coleta de dados nos estudos de dieta e predação podem estar vinculadas à observação do comportamento alimentar do predador diretamente no ambiente (Carter e Dixon 1982). Contudo, em muitas situações, não podem ser estabelecidas

ou quantificadas por meio da observação direta, principalmente devido às dificuldades, especialmente no que tange ao tamanho e hábitos dos predadores e presas, que em muitas situações são demasiadamente pequenos, habitam ambientes aquáticos, possuem hábitos alimentares noturnos, ou são evasivos e de difícil visualização. Portanto, determinar a dieta de heterópteros aquáticos diretamente no hábitat, por meio da observação direta, é um processo praticamente inviável. A análise do conteúdo estomacal do predador pode ser uma alternativa à observação do comportamento alimentar no ambiente natural, pois neste procedimento podem ser identificados restos de algumas presas no tubo digestório do mesmo. A maioria dos casos envolve a coleta dos predadores, seguida da análise visual (muitas vezes microscópica) do conteúdo estomacal (Hyslop 1980). A vantagem dessa abordagem é que antes da coleta, o sistema em estudo não é perturbado e, portanto, deve fornecer informações diretas sobre a dieta do animal. Um problema que surge nesta técnica é que nem todos os predadores ingerem presas que deixam vestígios no tubo digestório (*e.g.* heterópteros devido ao modo de alimentação extra oral), o que dificulta o procedimento devido aos tecidos não identificáveis e torna a análise visual do tubo digestório uma técnica inviável.

Para confrontar este tipo de problema, a biologia molecular surge como uma ferramenta inovadora e eficaz que pode se utilizada para solucionar o problema exposto. Técnicas moleculares estão tornando-se cada vez mais comuns em estudos ecológicos, o que tem impulsionado e aprimorado substancialmente os estudos de dieta e interações tróficas. A técnica baseia-se na presença de DNA de presas no tubo digestório de predadores, podendo ser extremamente precisa a ponto de identificar com pequena margem de erro as espécies que fazem parte da dieta do predador (Symondson 2002; Jarman et al. 2004; Sheppard e Harwood 2005; King et al. 2008; Pompanon et al. 2011; Piñol et al. 2013). No entanto, apesar do aspecto promissor da técnica baseada na análise de DNA para avaliar interações tróficas, ainda existem alguns percalços em relação a ela, visto que mesmo sendo possível detectar o DNA de outras espécies no tubo digestório do predador, não é possível determinar se esses predadores realmente exercem algum efeito significativo na estrutura da população daquela espécie apenas usando a técnica molecular. Ou seja, ainda que a predação ocorra, e vestígios de DNA da presa possam ser encontrados no tubo digestório do predador, algumas interações (predador-presa) são tão raras, que praticamente não têm nenhum efeito na população ou comunidade, enquanto que outras são tão frequentes que são extremamente importantes na dinâmica da população de presas. Uma outra fonte de erro pode ser a predação secundária (Harwood et al. 2001) que é a consequência de um predador consumir um segundo predador, pouco depois de este ter consumido a presa-alvo. Portanto, como na maioria dos casos o

interesse principal é na dinâmica populacional da interação predador-presa, são necessários estudos sobre dieta com base em DNA juntamente com experimentos *in situ* que avaliem o efeito do predador na comunidade de presas, e assim aprimorar o conhecimento sobre as relações tróficas de predadores sobre as comunidades biológicas.

1.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da técnica molecular, o conteúdo estomacal dos heterópteros *Martarega uruguayensis* Berg, 1883 e *Rheumatobates crassifemur* Esaki, 1926, visando avaliar a hipótese da presença de presas zooplanctônicas, assim como o efeito da predação do notonectídeo sobre a densidade de populações zooplanctônica de um lago tropical. O conteúdo estomacal foi avaliado por meio da detecção de vestígios de DNA das presas no tubo digestório dos predadores utilizando primers específicos. Para avaliar a influência dos predadores sobre a comunidade zooplanctônica, foi efetuado um experimento *in situ* utilizando mesocosmo. Com estas abordagens pretendeu-se responder às seguintes perguntas: (1) Existem vestígios de DNA das presas no tubo digestório do insetos coletados no ambiente natural?; (2) Ocorre diferença na proporção de presas detectadas no tubo digestório de insetos jovens e adultos?; (3) Existe maior frequência de DNA de alguma espécie de presa zooplanctônica no tubo digestório do predador?; (4) O efeito da predação foi capaz de influenciar a estrutura da comunidade zooplanctônica nos experimentos *in situ*? Para atender aos objetivos propostos, dividiu-se o trabalho em três capítulos que abordaram cada uma das etapas necessárias para responder as questões levantadas: O capítulo I descreve como foram escolhidos os biomarcadores moleculares das presas e o desenvolvimento dos primers necessários para a análise da dieta por meio da análise molecular; o capítulo II como foram identificadas as presas zooplanctônicas no tubo digestório dos heterópteros presentes no ambiente natural e alguns aspectos da dieta, como por exemplo se houve maior frequência do DNA de alguma espécie zooplanctônica; o capítulo III analisou, a partir do experimento em mesocosmo, o efeito do predador *M. uruguayensis* sobre as populações de presas zooplanctônicas.

1.2 Área de estudo

O hábitat das presas e predadores abordados neste estudo está localizado dentro do Campus da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto-SP (21º 10’ 04” S, 47º 51’ 28” O)

- Sudeste do Brasil (Figura 1.1). A região tem um clima tropical com duas estações bem definidas: quente-úmida (outubro a abril) e fria-seca (maio a setembro) (Arcifa et al. 1990). O lago tem uma diversidade relativamente baixa de microcrustáceos. As espécies de presas selecionadas para o desenvolvimento dos primers específicos foram os copépodos *Thermocyclops decipiens* Kiefer, 1929 e *Mesocyclops* sp.; e os cladóceros *Ceriodaphnia richardi* Sars, 1901*, Daphnia gessneri* Herbst, 1967*, Diaphanosoma* cf. *brevireme* Sars, 1901 e *Simocephalus serrulatus* Koch, 1841 (Figura 1.2). Os predadores estudados foram o notonectídeo *Martarega uruguayensis* e o gerrídeo *Rheumatobates crassifemur* (Figura 1.3).

Figura 1.1 - Imagem aérea do hábitat das presas e predadores.

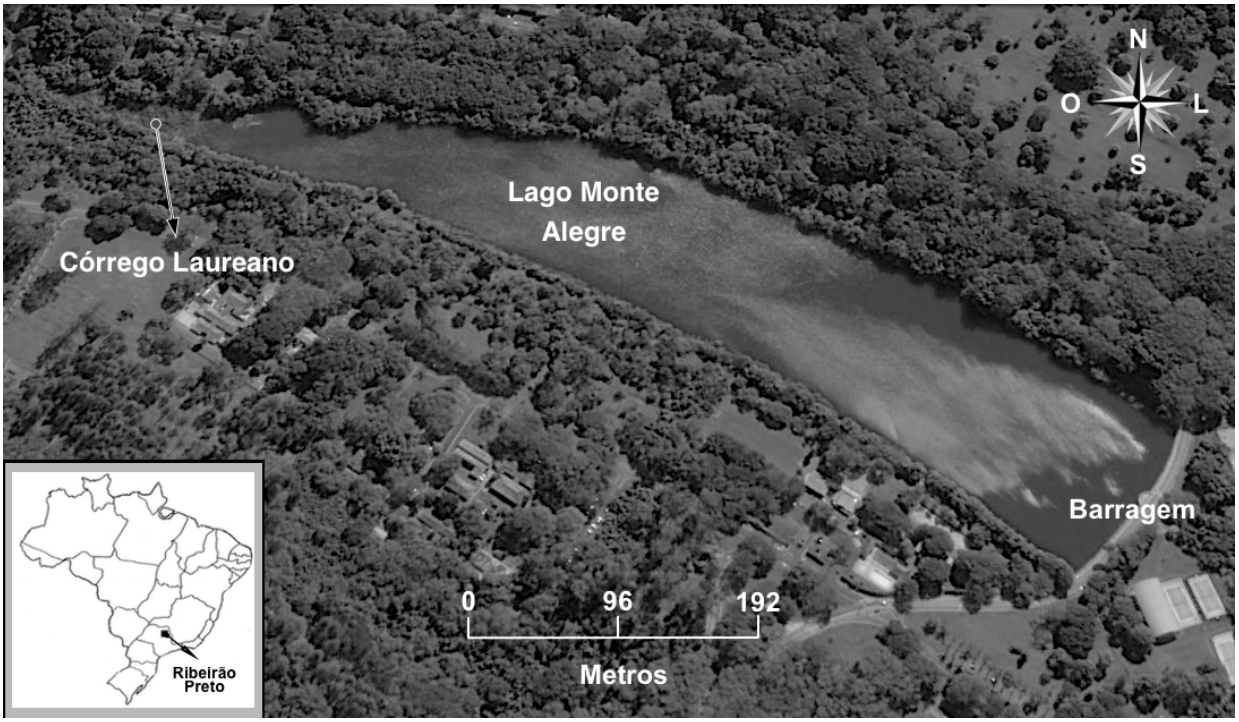


Figura 1.2 - Espécies de presas selecionadas: **(1)** *Simocephalus serrulatus*, **(2)** *Daphnia gessneri*, **(3)** *Ceriodaphnia richardi,* **(4)** *Diaphanosoma* cf. *brevireme*, **(5)** *Thermocyclops decipiens* e **(6)** *Mesocyclops* sp.

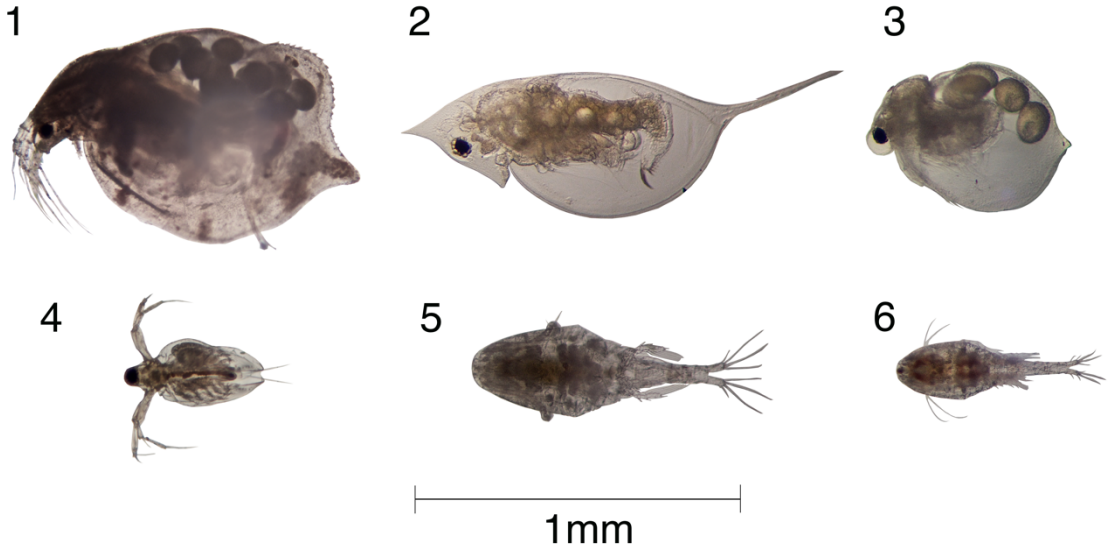
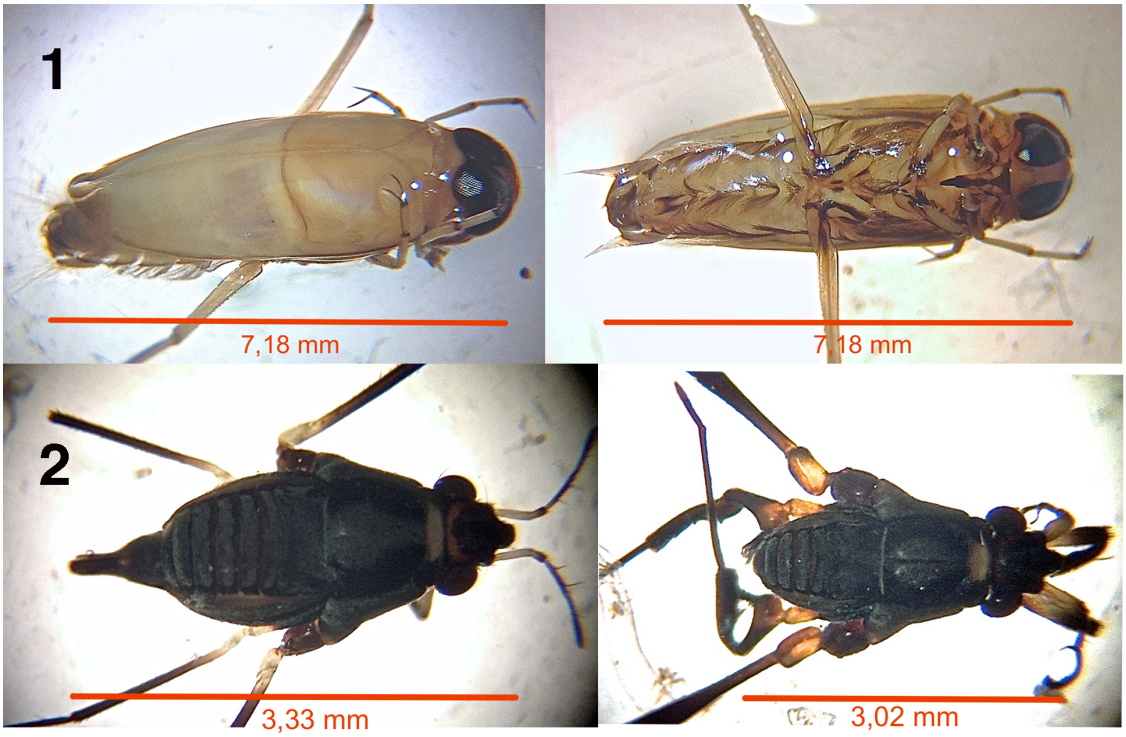


Figura 1.3 – Predadores heterópteros mais comuns no Lago Monte Alegre: **(1)** *Martarega uruguayensis* (Notonectidae) e **(2)** *Rheumatobates crassifemur* (Gerridae).



REFERÊNCIAS

AMARASEKARE, P., 2008. Spatial dynamics of foodwebs. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* Vol. 39(1), 479–500.

ANDERSEN, N.M., 1982. The semiaquatic bugs (Hemiptera: Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. *Entomonograph*. Vol. 3, 1–455.

ARCIFA, M.S., A.J. MESCHIATTI and E.A.T. GOMES, 1990. Thermal regime and stability of a tropical shallow reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Revue d´Hydrobiologie Tropicale*. Vol. 23(4), 271–281.

ARNÉR M., S. KOIVISTO, J. NORBERG and N. KAUTSKY, 1998. Trophic interactions in rockpool food webs: regulation of zooplankton and phytoplankton by *Notonecta* and *Daphnia*. *Freshwater Biology.* Vol. 39, 79–90.

BAILEY, P.C.E., 1987. Abundance and age-specific spatial and temporal distribution in two waterbug species, *Anisops deanei* (Notonectidae) and *Ranatra dispar* (Nepidae) in three farm dams in South Australia. *Oikos.* Vol. 49(1), 83–90.

BELGRANO A., U. SCHARLER, J.A. DUNNE and R.E. ULANOWICZ. *Aquatic Food Webs: An Ecosystem Approach*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 2005.

BENNETT, D.V. and F.A. STREAMS, 1986. Effects of vegetation on *Notonecta* (Hemiptera) distribution in ponds with and without fish. *Oikos.* Vol. 46(1), 62–69.

BLAUSTEIN, L., 1998. Influence of the predatory backswimmer *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecological Entomology.* Vol. 23, 246–252.

BLAUSTEIN, L., B.P. KOTLER and D. WARD, 1995. Direct and indirect effects of a predatory backswimmer (*Notonecta maculata*) on community structure of desert temporary pools. *Ecological Entomology.* Vol. 20(4), 311–318.

CARTER, M.C. and A.F.G. DIXON, 1982. Habitat quality and the foraging behaviour of coccinellid larvae. *Journal of Animal Ecology.* Vol. 51(3), 865–878.

COHEN, A.C., 1995. Extraoral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. *Annual Review of Entomology.* Vol. 40(1), 85–103.

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017a. Distribution and fluctuations of backswimmers (Notonectidae) in a tropical shallow lake and predation on microcrustaceans. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. *77*(1), 108–117

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017b. Spatial and temporal distribution of gerrid (Heteroptera) and predation on microcrustaceans from a tropical shallow lake. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. *77*(2), 289–298.

EITAM, A. and L. BLAUSTEIN, 2010. Effects of predator density and duration of predator occupancy on crustacean abundance and diversity in experimental pools. *Hydrobiologia*, Vol. 652, 269–276.

GILBERT, J.J. and C.W. BURNS, 1999. Some observations on the diet of the backswimmer, *Anisops wakefieldi* (Hemiptera: Notonectidae). *Hydrobiologia*. Vol. 412, 111–118.

HAMPTON, S.E. and J.J. GILBERT, 2001. Observations of insect predation on rotifers. *Hydrobiologia.* Vol. 446/447, 115–121.

HAMPTON, S.E., J.J. GILBERT and C.W. BURNS, 2000. Direct and indirect effects of juvenile *Buenoa macrotibialis* (Hemiptera: Notonectidae) on the zooplankton of a shallow pond. *Limnology and Oceanography*. Vol. 45(4),1006–1012.

HARWOOD, J.D., S.W. PHILLIPS, K.D. SUNDERLAND and W.O.C. SYMONDSON, 2001. Secondary predation: quantification of food chain errors in an aphid-spider-carabid system using monoclonal antibodies. *Molecular Ecology*. Vol. 10(8), 2049–2057.

HYSLOP, E.J., 1980. Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*. Vol.17, 411–429.

JARMAN, S.N., B.E. DEAGLE and N.J. GALES, 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*. Vol. 13(5), 1313–1322.

KING, R.A., D.S. READ, M. TRAUGOTT and W.O.C. SYMONDSON, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*. Vol. 17, 947–963.

MERRITT, K.W. and K.W. CUMMINS. *An introduction to the aquatic insects of North America.* (2nd ed), Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Co, 2008.

MURDOCH, W.W. and M.A. SCOTT, 1984. Stability and extinction of laboratory populations of zooplankton preyed on by the backswimmer *Notonecta*. *Ecology*. Vol. 64(4), 1231–1248.

NUMMELIN, M., K. VEPSÄLÄINEN and J.R. SPENCE, 1984. Habitat partitioning among developmental stages of waterstriders (Heteroptera: Gerridae). *Oikos.* Vol. 42(3), 267–275.

PIÑOL et al, J., V. SAN ANDRÉS, E.L. CLARE, E.L., G. MIR, et al., 2013 A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 14, 18–26.

POMPANON, F., B.E. DEAGLE, W.O.C. SYMONDSON, D.S. BROWN, et al., 2011. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*. Vol. 21(8), 1931–1950.

ROUGHGARDEN, J., 1983. Competition and theory in community ecology. *The American Naturalist*. Vol. 122(5), 583–601.

SCOTT, M.A. and W.W. MURDOCH, 1983. Selective predation by the backswimmer, *Notonecta*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 28(2), 352–366.

SHEPPARD, S.K. and J.D. HARWOOD, 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Functional Ecology*. Vol. 19(5), 751–762.

SPENCE, J.R. and N.M. ANDERSEN, 1994. Biology of water striders: interactions between systematics and ecology. *Annual Review of Entomology*. Vol. 39, 101–128.

SYMONDSON, W.O.C., 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*. Vol. 11, 627–641.

WHEELWRIGHT, N.T. and G.S. WILKINSON, 1985. Space use by a neotropical water strider (Hemiptera: Gerridae): sex and age-class difference. *Biotropica.* Vol. 17(2),165–169.

2 CAPÍTULO I - GUIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS ESPECÍFICOS DE ESPÉCIE PARA PCR: ESTUDO DE CASO BASEADO NA DETECÇÃO DO DNA DE MICROCRUSTÁCEOS NO TUBO DIGESTÓRIO DE HETERÓPTEROS AQUÁTICOS.

RESUMO

Foram desenvolvidos primers específicos de seis presas de microcrustáceos, *Ceriodaphnia richardi*, *Diaphanosoma* cf. *brevireme*, *Daphnia gessneri, Simocephalus serrulatus, Thermocyclops decipiens* e *Mesocyclops* sp., para analisar interações tróficas da cadeia alimentar envolvendo os predadores *Rheumatobates crassifemur* e *Martarega uruguayensis,* habitantes de um lago tropical raso no sudeste do Brasil. Foram criados primers de regiões internas do gene COI (177-282 pb), testando-se sua especificidade e sensibilidade por meio de PCR. Em testes de especificidade, todos os primers amplificaram com êxito o DNA alvo das presas, sendo incapazes de amplificar o biomarcador de qualquer outra espécie testada, mesmo em uma amostra de DNA mista, incluindo o DNA dos predadores. Em testes de sensibilidade, os primers amplificaram com sucesso os biomarcadores das presas zooplanctônicas mesmo em baixas concentrações de DNA, assim como diretamente do trato digestório dos predadores. Esta técnica surge como uma ferramenta eficiente para pesquisas de cadeias alimentares de ambientes aquáticos naturais, onde é impossível observar se a predação ocorre. Além disso, esta técnica fornece uma solução eficaz para a identificação de espécies de zooplâncton no trato digestório do predador, onde a identificação morfológica sozinha é algumas vezes difícil quando os predadores não consomem a presa por inteira, mas se alimentam por digestão extra oral, assim como é o caso dos heterópteros.

Palavras-Chave: Biomarcadores; zooplâncton; primers específicos; PCR; COI.

2 CHAPTER I - GUIDELINES TO DESIGN OF SPECIES SPECIFIC PRIMERS FOR PCR: A CASE STUDY BASED ON DNA DETECTION OF MICROCRUSTACEANS IN DIGESTIVE TRACT OF AQUATIC HETEROPTERA.

ABSTRACT

Specific primers were developed for six microcrustacean preys, *Ceriodaphnia richardi*, *Diaphanosoma* cf. *brevireme*, *Daphnia gessneri, Simocephalus serrulatus, Thermocyclops decipiens* and *Mesocyclops* sp., to analyze food web interactions involving their two insect predators *Rheumatobates crassifemur* and *Martarega uruguayensis* inhabitants of a tropical shallow lake in Brazil. We designed internal primers of the COI gene (177-282 bp), and tested them, by means of PCR, for specificity and sensitivity. In tests for specificity, all primers successfully amplified the DNA target but were species-specific failing to amplify the biomarker from any other species tested, even in a mixed DNA sample, including the predators' DNA. In tests for sensitivity, primers successfully amplified zooplankton biomarkers from low concentration of DNA extractions and also from digestive tract of predators, even after many hours of ingestion. This technique provides a framework as an efficient tool for evaluation of food web research in natural aquatic environments, where it is impossible to observe if predation occurs. Furthermore, this technique provides an effective solution for the identification of zooplankton species from the predator's digestive tract, where morphological identification alone is sometimes difficult because predators do not consume the whole prey, but feeds using extra oral digestion, such is the case of heteropterans.

Keywords: Biomarkers; Zooplankton; Specific primers; PCR; COI.

2.1 Introdução

As ferramentas da biologia molecular estão se tornando cada vez mais comuns nos estudos ecológicos, impulsionando e melhorando substancialmente em muitos aspectos os estudos, incluindo a dieta e as interações tróficas nos ecossistemas naturais (Symondson 2002; Jarman et al. 2004; Sheppard e Harwood 2005; King et al. 2008; Pompanon et al. 2012; Piñol et al. 2014). Técnicas moleculares são úteis para detectar vestígios de DNA de presas presentes no trato digestório ou nas fezes, tanto de predadores vertebrados (Jarman et al. 2002; Deagle et al. 2005; 2007; Deagle e Tollit 2007; Clare et al. 2009; Deagle et al. 2009; Soininen et al. 2009; Carreon-Martinez et al. 2011; Zeale et al. 2011) quanto invertebrados (Zaidi et al. 1999; Agustí et al. 2003a, 2003b; Harper et al. 2005; Vestheim et al. 2005, Vestheim e Jarman 2008; King et al. 2010; Töbe et al. 2010; Gamboa et al. 2012) que vivem em ambientes aquáticos ou terrestres.

Sequências específicas do DNA são usadas como biomarcadores de uma espécie de presa-alvo e podem ser amplificadas por meio da "Polymerase Chain Reaction" (PCR) (Palumbi et al. 1991; Palumbi, 1996). O conceito é bem sedimentado e baseia-se no pressuposto de que o DNA dos organismos consumidos por um predador não será completamente degradado durante a digestão e, portanto, pode ser detectado seguindo protocolos específicos. Os fragmentos de DNA das presas são extraídos do trato digestório do predador e amplificados por PCR seguido pela visualização dos produtos positivos em gel de agarose. Este processo é uma ferramenta de detecção de baixo custo, relativamente rápida, precisa e eficaz para estudar a dieta de predadores em ambientes naturais e em laboratório (Agustí et al. 1999; Asahida et al. 1997; Zaidi et al. 1999; Hoogendoorn e Heimpel 2001, Jarman et al. 2002; Greenstone e Shufran 2003, Agustí et al. 2003a, 2003b; Blankenship e Yayanos 2005; Deagle et al. 2005; Vestheim et al. 2005; Töbe et al. 2010; King et al. 2010).

No entanto, um passo crítico em qualquer estudo de dieta baseado em PCR é a seleção apropriada dos marcadores moleculares, bem como o protocolo adotado para processar as amostras. O gene mitocondrial, citocromo c oxidase I (COI), provou ser adequado para este propósito entre muitas outras utilidades, uma vez que a alta taxa das substituições de base permite a descriminação de espécies estreitamente associadas, havendo uma grande base de dados de bibliotecas de referência de sequências de códigos genéticos ("barcoding") para espécies de presas potenciais já disponíveis para comparar com esse gene (Ratnasingham e Hebert 2007). Adicionalmente, cada célula contém centenas de cópias do gene COI, aumentando a probabilidade de que os primers utilizados para amplificação do

biomarcador durante a reação de PCR se liguem ao DNA alvo (Hoy 2003). Além disso, pequenos fragmentos (100-300 pares de base - pb) da região do gene COI oferecem resolução ao nível de espécie e podem ser detectados em algum momento após a degradação pelo trato digestório (Agustí et al. 1999; Zaidi et al. 1999; Agustí et al. 2000; Hoogendoorn e Heimpel 2001; Agustí et al. 2003a; Hebert et al. 2003a, 2003b; Hajibabaei et al. 2006; Meusnier et al. 2008).

A detecção de vestígios de possíveis espécies de presas (biomarcador) no trato digestório de um predador a partir da amplificação do biomarcador pode ser feita utilizando primers universais (Asahida et al. 1997; Blankenship e Yayanos 2005; Vestheim e Jarman 2008; Simonelli et al. 2009; Carreon-Martinez et al. 2011; Gamboa et al. 2012). Contudo, esses primers amplificam regiões do gene COI que são conservadas em uma grande variedade de espécies (Kocher et al. 1989; Folmer et al. 1994), o que eleva a probabilidade desses primers se ligarem a uma espécie não alvo. Isso representa um problema para estudos que utilizam biomarcadores moleculares, onde o DNA do predador está frequentemente presente em grande excesso e/ou pode causar contaminação cruzada do biomarcador de presas. Para evitar este problema, primers específicos de uma única espécie ou de algumas espécies próximas filogeneticamente relacionadas podem ser desenvolvidos para amplificar uma região interna à região amplificada pelos primers universais, excluindo assim espécies não-alvo, como por exemplo outras presas que não são escopo do estudo, assim como dos próprios predadores (Jarman et al. 2002; Jarman et al. 2004; Harper et al. 2005; Jarman et al. 2006; Deagle et al. 2007; King et al. 2010; Zeale et al. 2011; Zarzoso-Lacoste et al. 2013). Os primers específicos de espécies são projetados para amplificar uma região de DNA de uma única espécie, pois são complementares de uma área do DNA exclusiva no organismo-alvo. Este método tornou-se popular porque é relativamente simples e com baixo custo para o desenvolvimento de primers que têm como alvo uma única espécie (Agustí et al. 2003a, 2003b; Harper et al. 2005; King et al. 2010; Töbe et al. 2010). No entanto, pode não ser apropriado se a gama potencial de presas for grande ou desconhecida, o que significa requerer um conhecimento *a priori* da dieta do predador em potencial. Sendo assim, é uma estratégia rápida e economicamente viável quando se estuda a dieta de um predador para um pequeno grupo de presas potenciais.

Estudos recentes sobre os aspectos bióticos e abióticos do lago tropical raso Monte Alegre, no sudeste do Brasil, mostraram que a predação por ácaro (Cassano et al. 2002) e larvas de Chaoboridae são os fatores mais importantes que moldam a comunidade zooplanctônica (Arcifa et al. 1992; Arcifa 2000; Castilho-Noll e Arcifa 2007a, 2007b; Arcifa

et al. 2015), influenciando também a migração vertical de micro-crustáceos (Minto et al. 2010). O impacto desses predadores parece ser mais forte durante a estação quente (Arcifa et al. 1992; Arcifa et al. 2015). Além disso, existem nesse ambiente alguns grupos de microcrustáceos (por exemplo, copépodos, *Daphnia* sp., *Diaphanosoma* sp. e *Ceriodaphnia* sp.) que foram descritos como presas de predadores de água doce em pesquisas experimentais em outros lagos (Streams 1987; Balseiro 1992; Mumm 1997; Arnér et al. 1998; Blaustein 1998; Jara 2012; Young e Riessen 2005). O número de predadores potenciais no Lago Monte Alegre é baixo o suficiente a ponto de que podem ser facilmente distinguidos por métodos morfológicos e moleculares. Também foram descritas potenciais relações predador-presa dos heterópteros *Martarega uruguayensis* (Notonectidae) e *Rheumatobates crassifemur* (Gerridae) neste lago (Domingos e Arcifa 2017a, 2017b). No entanto, para confirmar a hipótese de que heterópteros se alimentam de espécies zooplanctônicas no ambiente, é necessário encontrar evidências moleculares que suportam tal inferência.

Ao se utilizar este método, o passo mais importante é o desenvolvimento adequado dos primers. Eles devem ser suficientemente longos para serem específicos em relação às espécies, e evitar a formação de dímeros, além de ter alta temperatura de anelamento (Dieffenbach et al. 1993; Singh e Kumar 2001; Apte e Daniel 2009). Um primer de baixa qualidade pode resultar em pouco ou nenhum produto devido a amplificação não específica, ou formação de dímeros, levando à falha nas análises. A temperatura de anelamento ideal deve ser determinada empiricamente utilizando um gradiente de temperatura nas reações de PCR ou fazendo um "Touchdown PCR" (Korbie e Mattick 2008), com a temperatura de “melting” (Tm) > 55°C, o que permite que a PCR seja realizada com a alta temperatura, o que reduz a probabilidade de que os primers se liguem a locais indesejados, além de aumentar a eficiência da reação (King et al. 2008). Ademais, é aconselhável determinar as reações de PCR em baixas concentrações das extrações de DNA a fim de simular possíveis baixas concentrações que poderiam ser encontradas no tubo digestório dos predadores. Também é importante testar empiricamente se os primers desenvolvidos amplificarão o DNA de outros organismos diferentes da presa-alvo (*e.g.* predadores).

Os objetivos desta etapa foram desenvolver primers específicos para seis micro crustáceos de água doce para detectar fragmentos de DNA internos do gene COI dessas espécies, que em outros estudos foram relatados como presas potenciais de duas espécies de heterópteros aquáticos (Domingos e Arcifa, 2017a, 2017b). Os primers projetados foram testados quanto à especificidade, na presença de DNA não-alvo e para a sensibilidade em baixas concentrações de DNA.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área de estudo

O hábitat das presas e predadores deste estudo está localizado no Campus da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto-SP (21º 10 '04 "S, 47º 51' 28" W) - Sudeste do Brasil. A região tem um clima subtropical (Cwa de acordo com a classificação de Köppen) com duas estações bem definidas: quente-úmido (outubro a abril) e a seco (maio a setembro) (Arcifa et al. 1990; Alvares et al. 2014).

2.2.2 Coleta das espécies

O lago tem uma diversidade relativamente baixa de microcrustáceos (Arcifa et al. 1992; Arcifa et al. 2015). As presas zooplanctônicas selecionadas para o desenvolvimento dos primers específicos foram dois copépodos e quatro cladóceros que se acredita serem atacados pelos predadores heteróptero do ambiente (Domingos e Arcifa 2017a, 2017b): os copépodos *Thermocyclops decipiens* e *Mesocyclops sp.* e os cladóceros *Ceriodaphnia richardi*; *Daphnia gessneri*; *Diaphanosoma* cf. *brevireme* e *Simocephalus serrulatus*. A identificação das presas foi previamente confirmada por especialistas reconhecidos.

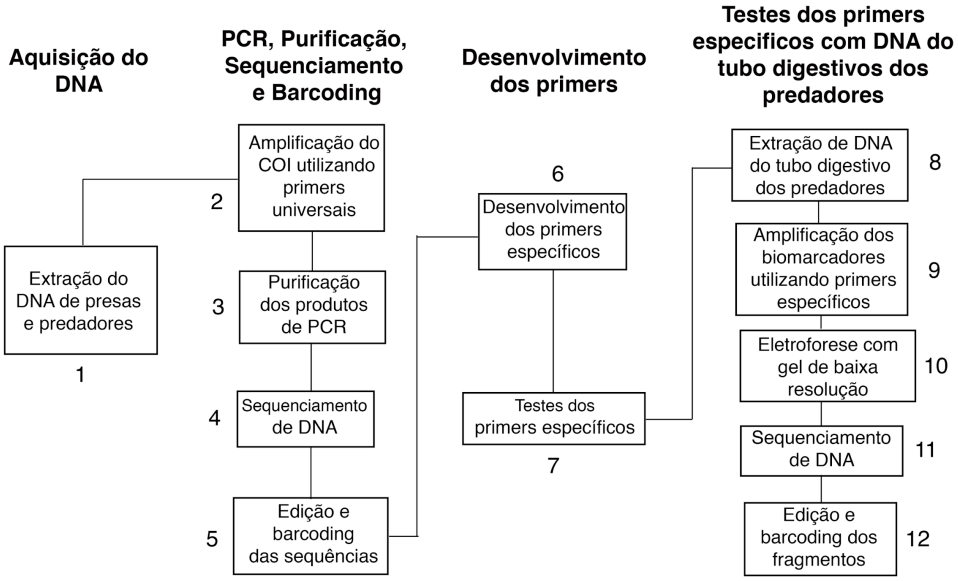
As potenciais presas zooplanctônicas utilizadas para desenvolvimento dos "primers" foram coletadas aproximadamente 3 dias antes da extração do seu material genético. Para a coleta foi utilizada uma rede de plâncton (malha 60 µm) por meio de arrastos verticais na coluna d'água, próximo à borda das macrófitas, com aproximadamente 1m de profundidade. No laboratório foram selecionadas preferencialmente as fêmeas que possuíam ovos em estágio avançado de desenvolvimento. Estes indivíduos foram isolados em pequenos tubos de vidro presos a uma roda de plâncton. Nos tubos foi adicionada água do lago filtrada em filtro milipore AP15 com adição de 1 mg C L^{-1} da clorofícea *Desmodesmus spinosus*. Nos dias posteriores, o indivíduo de cada tubo foi monitorado até a confirmação do desenvolvimento dos ovos e liberação dos neonatos (24-48h após o isolamento). Em seguida, o indivíduo adulto foi transferido para um segundo tubo de vidro com as mesmas características, porém sem alimento. Este procedimento de mudança de tubo sem adição de alimento foi adotado para excreção do conteúdo do tubo digestório dos indivíduos adultos, afim de diminuir a possibilidade de contaminação por material genético não pertencente à espécie no momento da extração do DNA, já que para a extração é utilizado o indivíduo inteiro. Após 8-15h, o

indivíduo adulto foi fixado em etanol 80% e mantido a -20ºC até a extração do material genético. Os indivíduos neonatos continuaram sendo alimentados e mantidos no primeiro tubo até alcançarem a fase adulta, adicionando-se alimento a cada 2 dias. Assim que chegaram à fase adulta foram fixados em álcool 80%, enviados a especialista para confirmação taxonômica da espécie e deposição do espécime em uma coleção apropriada. Os predadores foram coletados com uma rede em "D" através de arrastos horizontais a bordo de um barco. Os indivíduos foram fixados em álcool 80% e armazenados a -20 ºC até a extração do DNA.

2.2.3 Extração do DNA (passo 1)

O protocolo completo pode ser melhor seguido no diagrama de fluxo (Figura 2.1). O DNA total foi extraído utilizando o protocolo "Chelating Ion Exchange Resin" (Chelex® 100) (Estoup et al. 1996; Palero et al. 2010), com algumas modificações descritas abaixo. Cada espécie de presa e predador foi colocada individualmente em um tubo de micro centrifugação Eppendorf® de 1,5 ml e mantido em banho seco a 65 °C durante 30 min para evaporação do etanol restante da amostra. Foram adicionados 200 µl da solução Chelex (5%) e 10 µl de proteinase quinase (PK, 20 mg mL^{-1}) em cada tubo e colocados em banho seco a 55 °C durante 24 h para digestão de proteínas. A temperatura do banho seco foi aumentada para 95 °C durante 3 minutos para inativar a PK, seguido de um resfriamento rápido da amostra durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 18 °C durante 3 min, e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para tubos limpos. As concentrações de DNA de cada amostra foram medidas usando o espectrofotômetro Nano Drop® 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Figura 2.1 - Passos para o desenvolvimento e testes dos primers específicos (com base em Sheppard e Harwood 2005).



2.2.4 PCR, purificação e sequenciamento (passos 2 a 4)

O primer universal LCO1490 e HCO2198 (Folmers et al. 1994) foi utilizado para amplificar um fragmento (~ 700 pb) do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) das presas-alvo e dos predadores. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 1 a 50 nano gramas - ng de DNA ressuspenso, 1,2 M de Betaína, 200 M de cada dNTPs, 1,4 mM de $MgCl_2$, 1X Taq Buffer, 1µM de cada primer e 2U de Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 - Well® (Applied Biosystems) por 35 ciclos a 94 °C durante 30s, 40-48 °C durante 30s, e 72 °C durante 1 min. Um primeiro ciclo de desnaturação foi efetuada a 94 °C durante 2 min, e um último ciclo de extensão foi realizado a 72 °C durante 2 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, e os positivos foram purificados com o Kit SureClean Plus®. Os produtos purificados foram sequenciados em ambas as direções em um centro de sequenciamento na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. As sequencias obtidas foram depositadas no Genbank.

2.2.5 Edição e barcoding (passo 5)

As sequências foram editadas individualmente e um consenso de sequências complementares foi gerado com o software Bio Edit 7.0. A sequência consenso de cada espécie foi então comparada às sequências armazenadas no banco de dados do Genbank usando o algorítimo "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) para encontrar a sequência mais semelhante armazenada no banco de dados (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e confirmar a identificação da espécie.

2.2.6 Desenvolvimento dos primers das presas-alvo (passo 6)

Os primers específicos de espécies foram desenvolvidos utilizando o software Amplicon (Jarman 2004) seguindo as diretrizes de Dieffenbach et al. (1993), Singh e Kumar (2001) e Apte e Daniel (2009). Eles foram concebidos para conter entre 24 pb e 28 pb e amplificarem fragmentos de DNA variando de 170 pb a 282 pb do gene COI (biomarcadores). Utilizando o alinhamento das sequências consenso das espécies alvo, foram escolhidas regiões específicas para o desenvolvimento do primer específico de cada presa. A região designada foi a mais diferente possível, em termos de sequência de bases, da mesma região das sequências das outras espécies do alinhamento. Além disso, sempre que possível, a base nitrogenada da extremidade 3' do primer deveria ser diferente das bases correspondentes das outras sequências do alinhamento.

Posteriormente, o software NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/) foi utilizado para avaliar os parâmetros dos primers e orientar a seleção ideal com base na temperatura de desnaturação (Tm) e na estabilidade de suas estruturas secundárias. Este procedimento foi realizado para cada espécie de presa, totalizando 6 pares de primers específicos.

2.2.7 Testes da especificidade dos primers e a eficiência da amplificação em diferentes concentrações de DNA (passo 7)

Reações de PCR foram efetuadas para avaliar se os primers eram específicos em amplificar somente a espécie correspondente ao primer. As reações foram realizadas conforme descrito anteriormente, contudo, nesta etapa foi efetuado um primeiro ciclo de desnaturação a 95 °C durante 3 min, seguido por 37 ciclos a 94 °C durante 45s, 58-62 °C

durante 45s, e 72 °C durante 15s a 24s dependendo do primer utilizado, uma vez que a temperatura de anelamento e o tamanho dos biomarcadores são diferentes. Por fim, foi realizado um último ciclo de extensão a 72 °C durante 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% com marcadores de 50 pb a 500 pb com incrementos de 50 pb. Primeiramente, foram feitos testes da especificidade cruzando os diferentes primers desenvolvidos com as amostras individuais das extrações das presas e predadores, de modo a avaliar se amplificariam exclusivamente as amostras com a extração das espécies correspondentes ao primer específico. Este teste foi efetuado com amostras das extrações isoladas de cada espécie e com amostras das extrações de todas as espécies misturadas (simulando a condição do tubo digestório dos predadores, onde DNA de várias espécies podem ser encontradas). Os produtos positivos dos testes com as extrações das espécies misturadas foram purificados e sequenciadas em ambas as direções, seguindo a metodologia descrita anteriormente. O procedimento de sequenciamento foi efetuado afim de confirmar se o fragmento amplificado tem a mesma sequência que o biomarcador estipulado pelo primer. Além disso, efetuaram-se testes com diferentes concentrações de DNA (0,1 ng/µL; 0,5 ng/µL; 1,0 ng/µL; 2,5 ng/µL; 5,0 ng/µL and 10,0 ng/µL) afim de verificar se em baixas concentrações a banda visualizada no gel de agarose seria visível a ponto de confirmar a amplificação do biomarcador (simulando assim as possíveis baixas concentrações no tubo digestório dos predadores).

2.2.8 Teste com predadores em cativeiro (passos 8 a 12)

Uma vez estabelecido que os primers ampliariam com sucesso o DNA das extrações de presas, foram realizados dois testes com predadores alimentados em cativeiro. Ambos os testes foram feitos com *M. uruguayensis*, sendo um teste com *C. richardi* como presa e o outro *D. gessneri*. Os experimentos foram realizados em laboratório em béqueres de 1500 ml contendo aproximadamente 500 ml de água do lago filtrada. Primeiro, os predadores foram coletados no ambiente natural e mantidos no laboratório durante 3 dias sem alimentos para ser excretado todo o conteúdo do tubo digestório. Em seguida, os insetos foram divididos em 3 grupos (um inseto por béquer): Grupo 1 alimentado com *D. gessneri*; Grupo 2 alimentado com *C. richardi*; Grupo 3 sem alimentos. Os grupos que foram alimentados receberam presas por 5 dias. Após este período, os predadores foram fixados em 80% de etanol e armazenados a -20 °C 30 min após a ingestão de uma presa. Após este procedimento, realizaram-se extrações do DNA do tubo digestório dos predadores, seguido da PCR com os primers das

presas oferecidas, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. Os produtos de PCR positivos foram purificados e sequenciados em ambas as direções. As sequências complementares foram usadas para criar uma sequência consenso que foi usada para confirmar que apenas o DNA das espécies-alvo foi sequenciado (BLAST).

2.3 Resultados

2.3.1 "Barcoding" das espécies

Fragmentos de 601-701 pb foram amplificados e sequenciados a partir do gene COI de *C. richardi* (KY659308), *D. gessneri* (KY659310), *D.* cf. *brevireme* (KY659309), *M. uruguayensis* (KY659311), *R. crassifemur* (KY659312), *T. decipiens* (MF443204) e *Mesocyclops* sp. (MF443203) utilizando-se o primer universal LCO-1490 e HCO-2198 (os números entre parênteses são os respectivos números de acesso ao GenBank). Os resultados do BLAST juntamente com a árvore de distância resultante forneceram informações das espécies no banco de dados do GenBank que são filogeneticamente mais próximas às sequências consultadas. *Simocephalus serrulatus* foi agrupada com outros *S. serrulatus* e com um *Simocephalus* sp. não identificado (gb|KT706352.1|). A sequência de *D. gessneri* e *Diaphanosoma* cf. *brevireme* também corresponderam às mesmas espécies encontradas no GenBank (gb|AY323071.1|; gb|KC617616.1|, respectivamente). No entanto, não foi encontrada uma correspondência no GenBank para a sequência de *M. uruguayensis.* O grupo mais próximo encontrado foi o congênero *M. brasiliensis* (gb|JN689499.1) com 90% de similaridade. Após uma inspeção, foi encontrada uma sequência COI de *M. uruguayensis* no GenBank, mas o fragmento sequenciado veio de um fragmento do COI que não é a mesma região do Barcoding utilizada neste estudo (região de Palumbi), ou seja, foi utilizado um primer diferente. O mesmo ocorreu para as sequências de *R. crassifemur* e *T. decipiens*. Já *C. richardi,* é uma sinonímia de *C. dubia* (Kotov 2013), por isso a não correspondência de espécie no banco de dados. Elas têm uma semelhança superficial, que justificou no passado o estabelecimento da sinonímia, e Kotov et al. (2013) apenas replicaram esta ideia. No entanto, enquanto o pécten mediano da garra de *C. dubia* é apenas um pouco mais evidente do que os outros (pelos excelentes desenhos de Alonso (1996), a *C. richardi* tem este pécten bem mais forte. Por esta diferença e pelas atuais evidências de não cosmopolitismo em cladóceros, assim como as evidências moleculares apontadas na árvore filogenética resultante, foram consideradas como espécies distintas. Assim, as sequências de *M. uruguayensis, R.*

crassifemur, Ceriodaphnia richardi e T. decipiens são as primeiras registradas no GenBank para a seção Barcoding do gene COI. Uma das sequências de presa é proveniente de um *Mesocyclops* sp. não identificado que correspondeu também a *Mesocyclops* congenérico *edax* Forbes, 1891 (gb|JQ284449.1|), embora com um baixo valor de similaridade (83%). Vale ressaltar que ao consultar um especialista, ele não conseguiu identificar essas amostras ao nível de espécie. No entanto, há certeza de que é congenérico de *Mesocyclops* distribuídos nesta área.

2.3.2 Desenvolvimento dos primers das presas-alvo

As sequências do gene COI das espécies de presas e predadores foram alinhadas e comparadas, permitindo o desenvolvimento de seis pares de primers, um para cada espécie de presa. Os primers desenvolvidos foram CrFw-79/CrRv-248, DgFw-195/DgRv-371, DbFw-216/DbRv-497, SsFw-327/SsRv-574, TdFw-45/TdRv-254, TpFw-351/TpRv-587 (Tabela 2.1), que amplificaram fragmentos de 170, 177, 282, 248, 210 e 237 pares de bases (pb) respectivamente.

Tabela 2.1 - Lista dos primers desenvolvidos. **Fw:** "forward"; **Rv:** "reverse"

Espécie	Coleção	Nome Primer Fw	Sequência Primer Fw	Nº de bases Fw	Nome Primer Rv	Sequência Primer Rv	Nº de bases Rv	Temp. de anelamento (ºC)	Tam. amplicom (pb)
Ceriodaphnia richardi	EL02521	CrFw-79	GTGCCGAATTAGGTCAGTCAGGTAGTC	27	CrRv-248	GAACGCTATATCAGGAGCACCTAGTATC	28	61,8	170
Daphnia gessneri	EL02518	DgFw-195	CGGAAATTGGCTAGTCCCTTTAATGC	26	DgRv-371	GCGATACCAGCAGAAAGAGGAGGGTAC	27	61,9	177
Diaphanosoma brevireme	EL02517	DbFw-216	CCTCATACTAGGAGCACCAGACATG	25	DbRv-497	GGGTTATACCTTGAGATCGTATGTTT	26	59,1	282
Simocephalus serrulatus	EL02520	SsFw-327	GGCTGGGACAGGATGGACAGTTTAT	25	SsRv-574	CTGCCAAAACAGGAAGACTCAGTAA	25	59,5	248
Thermocyclops decipiens	MZUSP 36184	TdFw-45	GGGATGATTGGTACTGGACTAAGAG	25	TdRv-254	ACGAGGAAAAGCCATATCAGGAGA	24	58,7	210
Mesocyclops sp.	MZUSP 36185	MsFw-351	AGGTTGAACAGTTTATCCTCCTCTTAG	27	MsRv-587	GCCAATACTGGAAGAGACAAAAGC	24	58,0	237

2.3.3 Testes da especificidade dos primers e a eficiência da amplificação em diferentes concentrações de DNA

Todos os seis pares de primers foram testados individualmente quanto à especificidade contra o DNA de todas as 6 presas e 2 predadores heterópteros. A banda amplificada estava apenas presente nas extrações de amostras das espécies correspondentes ao primer específico testado (Figura 2.2). Além disso, os primers exibiram a formação de dímeros com 50 a 120 pb, especialmente com DgFw-195/DgRv-37 para a espécie *D. gessneri*. No entanto, a formação dos dímeros não comprometeu a amplificação dos biomarcadores. Os testes realizados com as extrações de DNA misturado também conseguiram amplificar os biomarcadores (Figura 2.3). O sequenciamento dos produtos de PCR positivos confirmou que os biomarcadores correspondiam às espécies de presas do primer utilizado.

Figura 2.2 - Testes da especificidade dos primers amplificando por PCR os biomarcadores das espécies. Foto com as bandas visualizadas em gel agarose. **Linha 1** marcador (500 pb); **Linha 2** (Dg) – *D. gessneri;* **Linha 3** (Cr) – *C. richardi;* **Linha 4** (Td) – *T. decipiens;* **Linha 5** (Ms) – *Mesocyclops* sp.*;* **Linha 6** (Db) – *D.* cf. *brevireme;* **Linha 7** (Ss) – *S. serrulatus;* **Linha 8** (Rc) – *R. crassifemur;* **Linha 9** (Mu) – *M. uruguayensis;* **Linha 10** (Blanc) – *Controle negativo.*

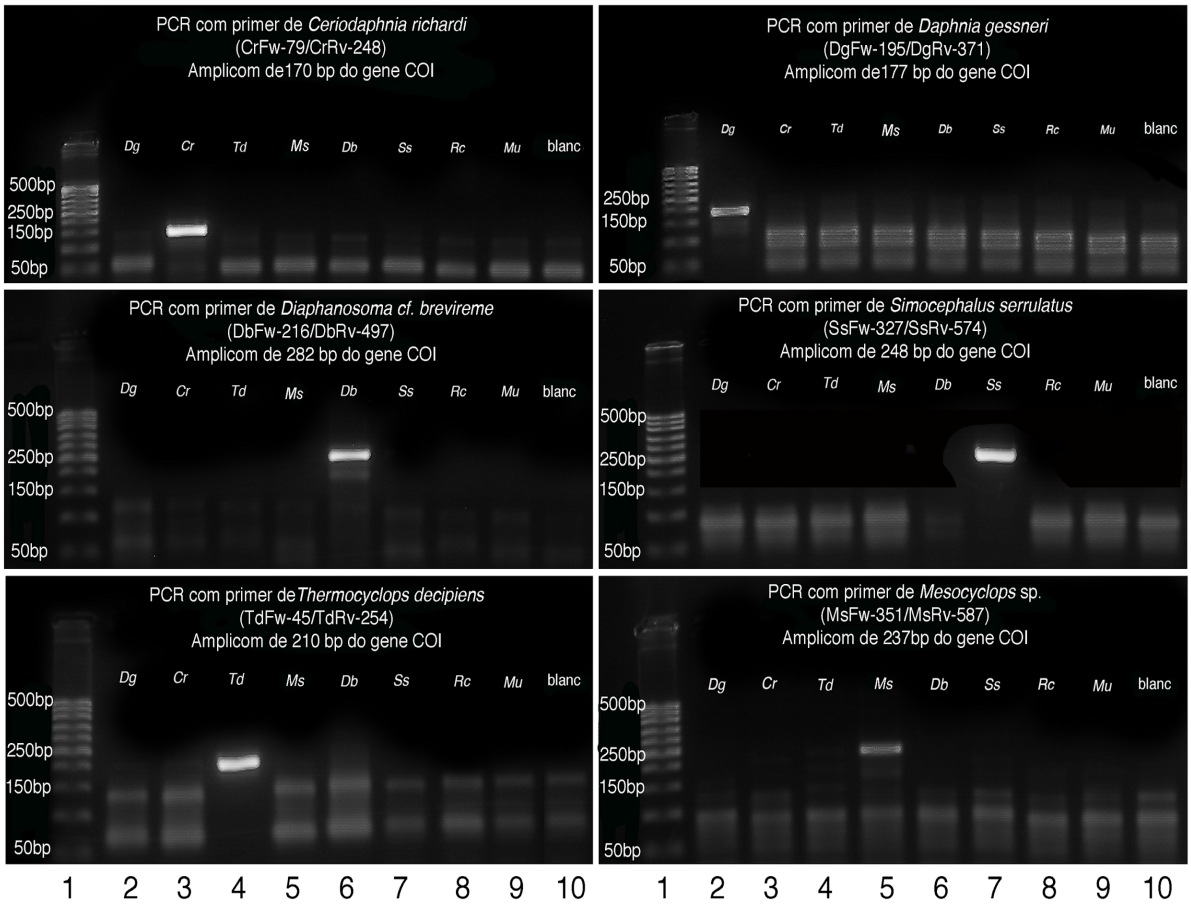
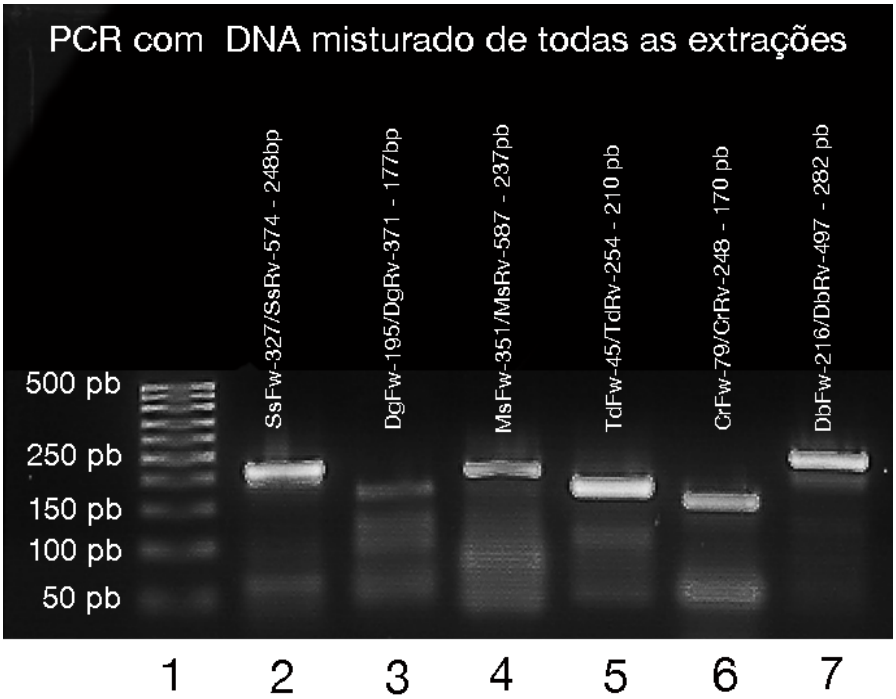
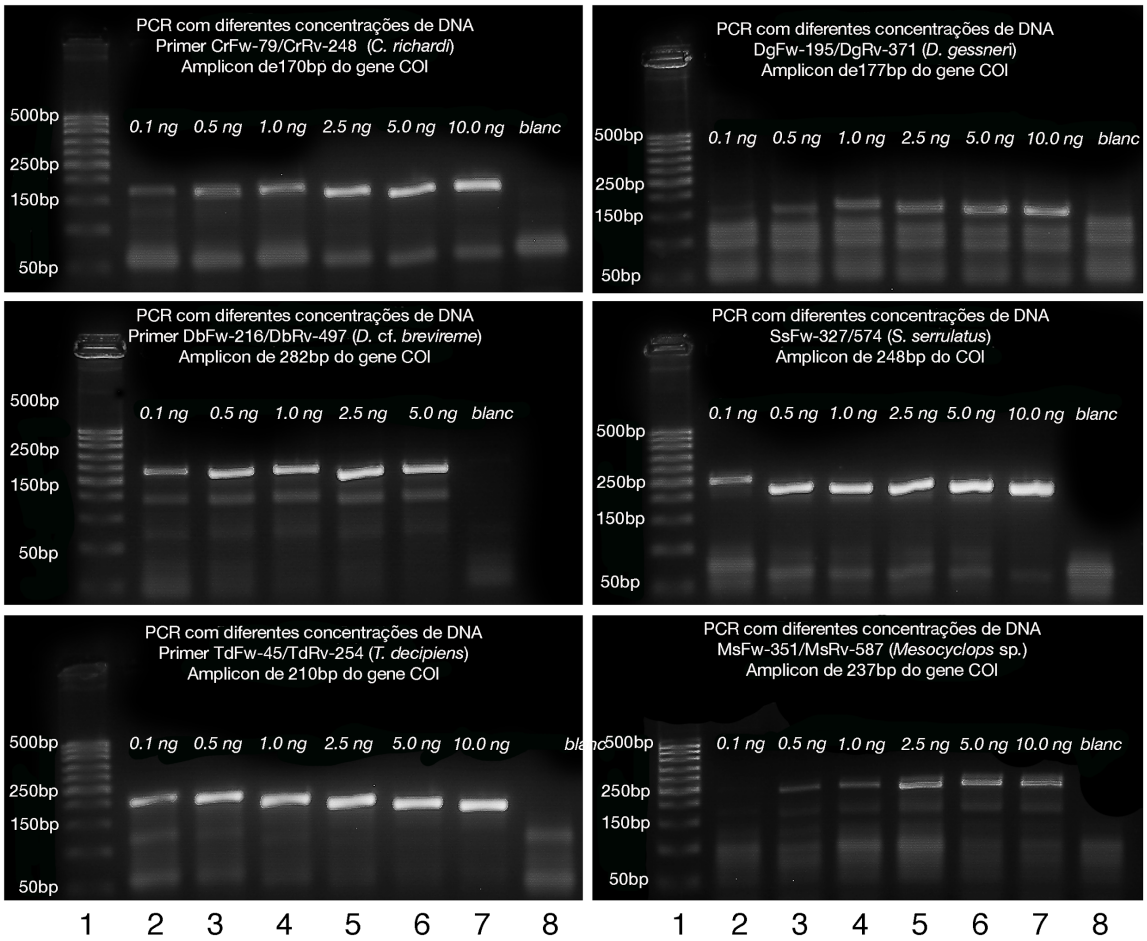


Figura 2.3 - Testes dos primers com amostras de DNA misturadas amplificadas por PCR e visualizadas em gel agarose. **Linha 1** marcador (500 pb); **Linha 2 -** *S. serrulatus* (248 pb); **Linha 3 -** *D. gessneri* (177 pb); **Linha 4** - *Mesocyclops* sp. (237 pb); **Linha 5** - *T. decipiens* (210 pb); **Linha 6 -** *C. richardi* (170 pb) e **Linha 7 -** *D.* cf. *brevireme* (282 pb).



Todos os seis pares de primers foram testados quanto à concentração de DNA das extrações para que a amplificação e visualização das bandas em gel agarose fosse possível, sendo que a concentração de DNA mínima necessária para amplificação e visualização da banda foi de 0,1 ng/µL de DNA, exceto para os primers de *Mesocyclops* sp. (MsFw-351/MsRv-587) que não amplificou a banda nesta concentração, e para *D. gessneri* (DgFw-195/DgRv-37), na qual a banda amplificada foi fraca, embora presente (Figura 2.4).

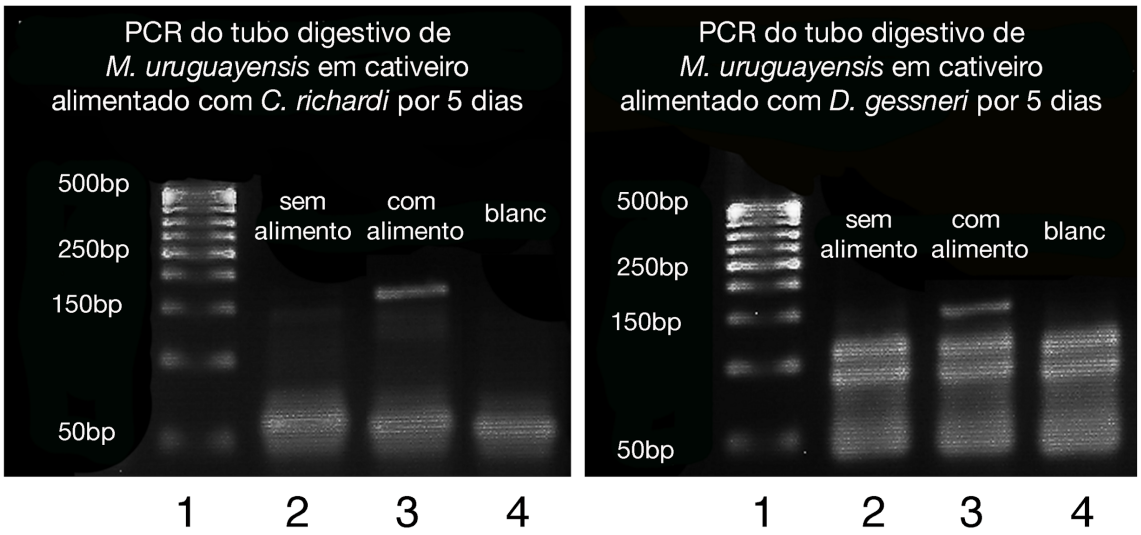
Figura 2.4 - Teste de eficiência dos primers para amplificar em reações de PCR biomarcadores das espécies de presas em diferentes concentrações de DNA. Foto com as bandas visualizadas em gel agarose. **Linha 1** marcador (500 pb); **Linha 2 -** 0.1 ng µL^{-1} de DNA; **Linha 3 -** 0.5 ng µL^{-1} de DNA; **Linha 4** - 1.0 ng µL^{-1} de DNA; **Linha 5 -** 2.5 ng µL^{-1} de DNA; **Linha 6** - 5.0 ng µL^{-1} de DNA**; Linha 7** - 10.0 ng µL^{-1} de DNA; **Linha 8** – Branco (Controle Negativo).



2.3.4 Teste com predadores em cativeiro

Os 2 testes feitos com predadores em cativeiro foram bem-sucedidos em amplificar os biomarcadores de *D. gessneri* e *C. richardi* (Figura 2.5). Os sequenciamentos dos produtos positivos confirmaram que os biomarcadores amplificados por PCR correspondiam a *D. gessneri* e *C. richardi.*

Figura 2.5 - Eletroforese em gel de agarose para testar se os primers amplificam por PCR os biomarcadores de *D. gessneri* e *C. richardi* presentes nos tubos digestórios de *M. uruguayensis* em cativeiro. **Linha 1 -** marcador (500 pb); **Linha 2 -** predador sem alimento**; Linha 3 -** predador alimentado**; Linha 4** (blanc) – Controle negativo.



2.4 Discussão

Os experimentos com biomarcadores mitocondriais revelaram resultados positivos para apoiar esta técnica como uma ferramenta eficiente para detectar espécies de microcrustáceos no conteúdo estomacal de insetos de água doce, especialmente quando a identificação morfológica sozinha é problemática. As vantagens de utilizar genes mitocondriais como biomarcadores são bem conhecidas; a ocorrência de múltiplas cópias por célula aumenta as chances de os primers encontrarem os locais de ligação-alvo, o que, por sua vez, melhora a detectabilidade dos biomarcadores (Hoy 2003; Agustí et al. 2003a). Mesmo pequenos fragmentos do segmento utilizado para o "barcoding" são úteis para a identificação de espécies, tornando-o adequado para este tipo de estudo (Simon et al. 1994; Caterino et al. 2000). Essa avaliação incluiu insetos para os quais é praticamente impossível confirmar se a

predação sobre espécies zooplanctônicas no ambiente natural ocorre, pois eles digerem suas presas extra-oralmente, o que torna inviável a identificação do conteúdo estomacal. Assim, os desafios para estudar este sistema de predador-presa são muitos; tanto predadores como presas zooplanctônicas são pequenas e ambos vivem em ambiente aquático. Assim, parece necessário o uso de ferramentas moleculares para esse tipo de investigação.

Para o desenvolvimento dos primers específicos dos biomarcadores, foram utilizados fragmentos internos do gene COI, que variaram de 177-282 pb, uma vez que este tamanho de fragmento pode ser detectado por um longo período após a ingestão da presa, aumentando consideravelmente a probabilidade e a duração da detecção devido à digestão (Zaidi et al. 1999; Hoogendoorn e Heimpel 2001), e também porque fragmentos muito curtos (100-250 pb) da região do COI podem fornecer identificação correta em nível de espécie (90-95%) de eucariotos (Hajibabaei et al. 2006; Meusnier et al. 2008). Em todos os casos, os primers amplificaram apenas as espécies-alvo.

Os testes com DNA misturado foi um passo importante para assegurar sua eficiência, uma vez que este experimento simulou as condições encontradas no tubo digestório dos predadores aqui avaliados. Tanto *M. uruguayensis* quanto *R. crassifemur* são predadores generalistas, podendo alimentar-se de várias espécies diferentes (Cummins 1973; Peckarsky 1982), portanto, uma fonte mista de DNA pode ser encontrada nos seus tratos digestórios. O sequenciamento dos produtos positivos de DNA misturado confirmou a especificidade dos primers, assegurando que os biomarcadores amplificados correspondem às espécies de presas deste estudo. Isso também é importante porque, em uma fonte rica em DNA, os primers podem se ligar a regiões não-alvo ("false priming"), o que desafia nossa busca de um biomarcador específico que seja funcional. Dessa forma, foi preciso desenvolver primers para realizar a PCR em altas temperaturas (anelamento T > 50 °C), o que garante a alta especificidade dos mesmos (Singh e Kumar 2001) minimizando a possibilidade de "false priming".

A partir do experimento com predadores alimentados em cativeiro, não é possível concluir quanto tempo após a ingestão os biomarcadores podem ser detectados pela reação de PCR, pois foi estabelecida a fixação do predador 30 minutos após a última ingestão do conteúdo de presas. No entanto, estudos recentes sobre o desenvolvimento de técnicas baseadas em DNA para analisar a predação mostraram que sequências curtas de biomarcadores podem ser detectadas no trato digestório do predador muito tempo após a ingestão da presa (Agustí et al. 1999, 2000; Hoogendoorn e Heimpel 2001; Agustí et al. 2003a). Zaidi et al. (1999) mostraram que pequenas sequências de cerca de 146 pb poderiam

ser amplificadas a partir do tubo digestório do predador 28 h após a ingestão da presa. Os primers deste estudo amplificaram fragmentos acima de 177 pb e abaixo de 282 pb. Assim sendo, é possível que os biomarcadores possam ser detectados no mesmo período de 28 h após a ingestão. Esta aplicabilidade foi corroborada nos experimentos com diferentes concentrações de DNA, onde foram amplificadas com sucesso mesmo aquelas amostras com concentrações muito baixas de DNA (~ 0,1 ng/µL), que simulam uma alta taxa de degradação do DNA no tubo digestório do predador após um longo período.

Em conclusão, os primers específicos para biomarcadores das espécies de presas foram úteis para detectar inequivocamente o DNA-alvo quando presente em uma amostra e nunca amplificam nenhum outro produto quando o DNA-alvo não está presente, o que proporcionou uma solução efetiva para a identificação de espécies de presas no trato digestório do predador, onde a identificação morfológica por si só é algumas vezes difícil e problemática. O método que utiliza primers específicos de espécies também deve ser uma boa escolha para estudar interações trófica em ambientes naturais, uma vez que essa análise baseada em PCR representa um distúrbio mínimo no sistema em estudo. Uma vez que as sequências do COI da presa-alvo são obtidas e os primers específicos da presa são desenvolvidos, testados e publicados, eles podem ser usados para se estudar interações tróficas em ecossistemas onde as espécies de presas *T. decipiens, Mesocyclops* sp., *C. richardi*, *D. gessneri*, *Diaphanosoma* cf. *brevireme* e *S. serrulatus* estão presentes. Além disso, esse método pode ser expandido para estudar predação e interação da biodiversidade em qualquer ecossistema diferente desse, com diferentes comunidades de predadores e presas. Tanto quanto se saiba, este é o primeiro estudo sobre a detecção de biomarcadores utilizando primers específicos de espécies realizado em lagos brasileiros.

REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, N., M.C. DE VICENTE and R. GABARRA, 1999. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology.* Vol. 8(9), 1467–1474.

AGUSTÍ, N., M.C. DE VICENTE and R. GABARRA, 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*. Vol. 9(3), 263–268.

AGUSTÍ, N., S.P. SHAYLER, J.D. HARWOOD, I.P VAUGHAN, K.D. et al., 2003a. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular ecology*. Vol. 12, 3467–3475.

AGUSTÍ, N., T.R. UNRUH and S.C. WELTER, 2003b. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bulletin of Entomological Research*. Vol. 93(3), 179–185.

ALONSO, M. *Fauna Iberica, Vol. 7. Crustacea, Branchiopoda.* Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid: 1996.

ALVARES, C.A., J.L. STAPE, P.C. SENTELHAS, J.L. DE MORAES GONÇALVES, et al., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische. Zeitschrift.* Vol. 22(6), 711–728.

APTE, A. and S. DANIEL, 2009. PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols.* Vol. 3(4), 1–10.

ARCIFA, M.S., 2000. Feeding habits of Chaoboridae larvae in a tropical Brazilian reservoir. *Revista Brasileira de Biologia=Brazilian Journal of Biology.* Vol. 60(4), 591–597.

ARCIFA, M.S., A.J. MESCHIATTI and E.A.T. GOMES, 1990. Thermal regime and stability of a tropical shallow reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Revue d´Hydrobiologie tropicale*. Vol. 23(4), 271–281.

ARCIFA, M.S., E.A.T. GOMES and A.J. MESCHIATTI, 1992. Composition and fluctuations of the zooplankton of a tropical Brazilian reservoir. *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 123(4), 479–495.

ARCIFA, M.S., T.C.S. FERREIRA, C. FILETO, M.S.M. CASTILHO-NOLL, et. al., 2015. A long-term study on crustacean plankton of a shallow tropical lake: the role of invertebrate predation. *Journal of Limnology*. Vol. 74(3), 606–617.

ARNÉR M., S. KOIVISTO, J. NORBERG and N. KAUTSKY, 1998. Trophic interactions in rockpool food webs: regulation of zooplankton and phytoplankton by *Notonecta* and *Daphnia*. *Freshwater Biology.* Vol. 39, 79–90.

ASAHIDA, T., Y. YAMASHITA and T. KOBAYASHI, 1997. Identification of consumed stone flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilewsky), from the stomach contents of sand shrimp,

Crangon affinis (De Haan) using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* Vol. 217(2), 153–163.

BALSEIRO, E.G., 1992. The role of pelagic water mites in the control of cladoceran population in a temperate lake of the southern Andes. *Journal of Plankton Research.* Vol. 14, 1267–1277.

BLANKENSHIP, L.E. and A.A YAYANOS, 2005. Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets. *Molecular Ecology.* 14(3), 891–899.

BLAUSTEIN, L., 1998. Influence of the predatory backswimmer *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecological Entomology.* Vol. 23, 246–252.

CARREON-MARTINEZ, L., T.B. JOHNSON, S.A. LUDSIN and D.D. HEATH, 2011. Utilization of stomach content DNA to determine diet diversity in piscivorous fishes. *Journal of Fish Biology.* Vol. 78(4), 1170–1182.

CASSANO, C.R., M.S.M. CASTILHO-NOLL and M.S. ARCIFA, 2002. Water mite predation on zooplankton of a tropical lake. *Brazilian Journal of Biology.* Vol. 62(4A), 565–571.

CASTILHO-NOLL, M.S.M. and M.S. ARCIFA, 2007a. *Chaoborus* diet in a tropical lake and predation of microcrustaceans in laboratory experiments. *Acta Limnologica. Brasiliensia.* Vol. 19(1), 163–174.

CASTILHO-NOLL, M.S.M. and M.S. ARCIFA, 2007b. Mesocosm experiment on the impact of invertebrate predation on zooplankton of a tropical lake. *Aquatic Ecology.* Vol. 41, 587–598.

CATERINO, M.S., S. CHO and F.A. SPERLING, 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology.* Vol. 45, 1–54.

CLARE, E.L., E.E. FRASER, H.E. BRAID, M.B. FENTON, et al., 2009. Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): using a molecular approach to detect arthropod prey. *Molecular Ecology.* Vol. 18(11), 2532–2542.

CUMMINS, K.W, 1973. Trophic relations of aquatic insects. *Annual Review of Entomology.* Vol. 18, 183–206.

DEAGLE, B.E. and D.J. TOLLIT, 2007. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition? *Conservation Genetics.* Vol. 8(3), 743–747.

DEAGLE, B.E., D.J. TOLLIT, S.N. JARMAN, M.A. HINDELL, et al., 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology.* Vol. 14(6), 1831–1842.

DEAGLE, B.E., N.J. GALES, K. EVANS, S.N. JARMAN, et.al., 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: a case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). *PLoS One.* Vol. 2(9), e831–e831.

DEAGLE, B.E., R. KIRKWOOD and S.N. JARMAN, 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology.* Vol. 18(9), 2022–2038.

DIEFFENBACH, C.W., T.M. LOWE and G.S. DVEKSLER, 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications.* Vol. 3(3), S30–S37.

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017a. Distribution and fluctuations of backswimmers (Notonectidae) in a tropical shallow lake and predation on microcrustaceans. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. 77(1), 108–117

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017b. Spatial and temporal distribution of gerrid (Heteroptera) and predation on microcrustaceans from a tropical shallow lake. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. 77(2), 289–298.

ESTOUP, A., C.R. LARGIADER, E. PERROT and D. CHOURROUT, 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* Vol. 5(4), 295–298.

FOLMER, O.O., M.M. BLACK, W.W. HOEH, R.R. LUTZ, et al., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* Vol. 3(5), 294–299.

GAMBOA, M., R.K. KIMBIRAUSKAS, R.W. MERRITT and M.T. MONAGHAN, 2012. A Molecular approach to identifying the natural prey of the african creeping water bug *Naucoris*, a potential reservoir of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Insect Science.* Vol. 12(2), 1–10.

GREENSTONE, M.H. and K.A. SHUFRAN, 2003. Spider predation: species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. *Journal of Arachnology.* Vol. 31(1), 131–134.

HAJIBABAEI, M., M.A. SMITH, D.H. JANZEN, J.J. RODRIGUEZ, et al., 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes. Vol.* 6(4), 959–964.

HARPER, G.L., R.A. KING, C.S. DODD, J.D. HARWOOD, et al., 2005. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Molecular Ecology.* Vol. 14(3), 819–827.

HEBERT, P.D.N., A. CYWINSKA, S.L. BALL and J.R. DE WAARD, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. of the Royal Society B: Biological Sciences.* Vol. 270(1512), 313–321.

HEBERT, P.D.N., S. RATNASINGHAM and J.R. DE WAARD, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. of the Royal Society B: Biological Sciences.* Vol. 270(Supp l), S96–S99.

HOOGENDOORN, M. and G.E. HEIMPEL, 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology.* Vol. 10(8), 2059–2067.

HOY, M.A., 2003. Insect molecular genetics: An introduction to principals and applications. Academic Press, San Diego, US-CA, pp. 544.

JARA, F.G., M.G. PEROTTI and M.C. DIÉGUEZ, 2012. Distribution of backswimmers in shallow ponds of Patagonia and their predatory role on a common tadpole–copepod assemblage. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* Vol. 46(4), 459–473.

JARMAN, S.N., 2004. Amplicon: software for designing PCR primers on aligned DNA sequences. *Bioinformatics*. Vol. 20(10), 1644–1645.

JARMAN, S.N., B.E. DEAGLE and N.J. GALES, 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*. Vol. 13(5),1313–1322.

JARMAN, S.N., K.S. REDD and N.J. GALES, 2006. Group-specific primers for amplifying DNA sequences that identify Amphipoda, Cephalopoda, Echinodermata, Gastropoda, Isopoda, Ostracoda and Thoracica. *Molecular Ecology Notes.* Vol. 6(1), 268–271.

JARMAN, S.N., N.J. GALES, M. TIERNEY, P.C. GILL, et al., 2002. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Molecular Ecology.* Vol. 11(12), 2679–2690.

KING, R.A., D.S. READ, M. TRAUGOTT and W.O.C. SYMONDSON, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*. Vol. 17, 947–963.

KING, R.A., I.P. VAUGHAN, J.R. BELL and D.A. BOHAN, 2010. Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species- and lineage-specific PCR primers. *Molecular Ecology.* Vol. 19, 1721–1732.

KOCHER, T.D., W.K. THOMAS, A. MEYER, S.V. EDWARDS, et al., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings. of the Royal Society B: Biological Sciences.* Vol. 86(16), 6196–6200.

KORBIE, D.J. and J.S. MATTICK, 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols.* Vol. 3(9), 1452–1456.

KOTOV, A.A., K. VAN DAMME, E.I. BEKKER, S. SIBOUALIPHA, et al., 2013. Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) of Vientiane province and municipality, Laos. *Journal of Limnology*. Vol. 72(S2), 81–108.

MEUSNIER, I., G.A.C. SINGER, J.F. LANDRY, D.A. HICKEY, et al., 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics.* Vol. 9(1), 1–4.

MINTO, W.J., M.S. ARCIFA and A. PERTICARRARI, 2010. Experiments on the influence of *Chaoborus brasiliensis* Theobald, 1901 (Diptera: Chaoboridae) on the diel vertical migration of microcrustaceans from Lake Monte Alegre. *Brazilian Journal of Biology.* Vol. 70(1), 25–35.

MUMM, H., 1997. Effects of competitors and *Chaoborus* predation on the cladocerans of a eutrophic lake: An enclosure study. *Hydrobiologia*. Vol. 360, 253–264.

PALERO, F., S. HALL, P.F. CLARK, D. JOHNSTON, et. al., 2010. DNA extraction from formalin-fixed tissue: new light from the deep sea. *Scientia Marina.* Vol. 74(3), 465–470.

PALUMBI, S.R.. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D. M., C. MORITZ and B.K. MABLE, (eds). *Molecular systematics*, (2nd ed). Sunderland, Sinauer, , US-MA: 1996.

PALUMBI, S.R., A. MARTIN, S. ROMANO W.O. MCMILLAN, et al.. *The simple fool's guide to PCR, Version 2.0.* University of Hawaii, US-HI: 1991.

PECKARSKY, B.L., 1982. Aquatic insect predator-prey relations. *Bioscience.* Vol. 32(4), 261–266.

PIÑOL, J., V. SAN ANDRÉS, E.L. CLARE, G. MIR, et al., 2014 A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 14(1), 18–26.

POMPANON, F., B.E. DEAGLE, W.O.C. SYMONDSON, D.S. BROWN, et al., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*. Vol. 21(8), 1931–1950.

RATNASINGHAM, S. and P.D.N. HEBERT, 2007. Bold: The barcode of life data system (http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Resource.* Vol. 7(3), 355–364.

SHEPPARD, S.K. and J.D. HARWOOD, 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Functional Ecology*. Vol. 19(5), 751–762.

SIMON, C., F. FRATI, A. BECKENBACH, B. CRESPI, et al., 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.* Vol. 87, 651–701.

SIMONELLI, P., C. TROEDSSON, J.C. NEJSTGAARD, K. ZECH, et al., 2009. Evaluation of DNA extraction and handling procedures for PCR-based copepod feeding studies. *Journal of Plankton Research.* Vol. 31(12), 1465–1474.

SINGH, V.K. and A. KUMAR, 2001. PCR primer design. *Molecular Biology Today.* Vol. 2(2), 27–32.

SOININEN, E.M., A. VALENTINI, E. COISSAC, C. MIQUEL, et al., 2009. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Frontiers in. Zoology.* Vol. 6, 1–9.

STREAMS, F.A., 1987. Foraging behavior in a notonectid assemblage. *American Midland Naturalist.* Vol. 117(2), 353–361.

SYMONDSON, W.O.C., 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*. Vol. 11, 627–641.

TÖBE, K., B. MEYER and V. FUENTES, 2010. Detection of zooplankton items in the stomach and gut content of larval krill, *Euphausia superba*, using a molecular approach. *Polar Biology.* Vol. 33(3), 407–414.

VESTHEIM, H. and S.N. JARMAN, 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology.* Vol. 5(1), 1–11.

VESTHEIM, H., B. EDVARDSEN and S. KAARTVEDT, 2005. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific PCR. *Marine Biology.* Vol. 147(2), 381–385.

YOUNG, J.D. and H.P. RIESSEN, 2005. The interaction of *Chaoborus* size and vertical distribution determines predation effects on *Daphnia*. *Freshwater Biology.* Vol. 50, 993–1006.

ZAIDI, R.H., Z. JAAL, N.J. HAWKES, J. HEMINGWAY, et al., 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology.* Vol. 8(12), 2081–2087.

ZARZOSO-LACOSTE, D., E. CORSE and E. VIDAL, 2013. Improving PCR detection of prey in molecular diet studies: importance of group-specific primer set selection and extraction protocol performances. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 13(1), 117–127.

ZEALE, M.R.K., R.K. BUTLIN, G.L.A. BARKER and D.C. LEES, 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources.* Vol. 11, 236–244.

3 CAPÍTULO II - ANÁLISE DO CONTEÚDO ESTOMACAL DE *Rheumatobates crassifemur* E *Martarega uruguayensis* (HETEROPTERA) POR MEIO DE PCR: UM ESTUDO DE CAMPO ULILIZANDO PRIMERS ESPECÍFICOS PARA ESTIMAR A PREDAÇÃO SOBRE MICROCRUSTÁCEOS.

RESUMO

Alguns estudos mostraram que os heterópteros aquáticos podem influenciar a estrutura das comunidades zooplanctônicas. No entanto, parte destes estudos foram realizados em experimentos de laboratório. Para avaliar sua dieta diretamente no hábitat natural foi proposta uma abordagem molecular para identificar pequenos fragmentos de DNA das presas no tubo digestório do predador. Os predadores foram coletados no ambiente e o DNA de seus tubos digestórios foram extraídos. Por meio de reações de PCR com os primers específicos das presas-alvo foi avaliada a frequência de positivos para estimar alguns aspectos de sua dieta. No total, 48 reações de PCR foram realizadas com o tubo digestório de 240 predadores. As espécies que foram altamente selecionadas foram *S. serrulatus* e *D. gessneri*. A espécie com menor índice de eletividade foi *D.* cf. *brevireme*, apesar de sua maior abundância no ambiente. Notonectídeos jovens alimentam-se de mais espécies zooplanctônicas que indivíduos adultos, já que possivelmente presas zooplanctônicas sejam de maior dificuldade de manipulação para os indivíduos adultos. No entanto, para gerrídeo, principalmente devido a seu modo de vida semi-aquático, suspeita-se que parte de sua alimentação seja proveniente de indivíduos mortos ou presos à superfície da água, já que existe a dificuldade de encontro do predador com a presa planctônica. Tanto para gerrídeos quanto para notonectídeos há uma seletividade acentuada por espécies de presas de maior tamanho, mesmo que com menor frequência relativa no ambiente quando comparadas a outras espécies. Acredita-se que a preferência por presas maiores esteja relacionada à maior facilidade para detecção e manipulação por parte do predador. A frequência de biomarcadores nos tubos digestórios de *M. uruguayensis* foram maiores no período com maior disponibilidade de presas, pois quanto maior a densidade de presas no ambiente menor o tempo necessário para localizá-las e persegui-las. Assim, conclui-se que o método utilizado foi bem sucedido em vasculhar vestígios das presas a partir do DNA, e heterópteros podem potencialmente influenciar a estrutura da comunidade zooplanctônica em um lago tropical raso.

Palavras-chave: Interações tróficas; microcrustáceos; COI; PCR; lago tropical raso.

3 CHAPTER II - ANALYSIS OF THE GUT CONTENTS OF *Rheumatobates crassifemur* E *Martarega uruguayensis* (HETEROPTERA) BY PCR: A FIELD STUDY USING SPECIFIC PRIMERS TO ESTIMATE PREDATION ON MICROCRUSTACEANS.

ABSTRACT

A few studies have shown that aquatic heteroptera can influence the structure of zooplanktonic communities. However, these studies were performed in laboratory experiments. To evaluate their diet directly in the natural habitat it was proposed a molecular approach to identify small DNA fragments of the prey in the predator's digestive tract. The predators were collected in the environment and the DNA from their guts were extracted. By means of PCR reactions using specific primers of the target prey the frequency of positives was evaluated to estimate some aspects of their diet. In total, 48 PCR reactions were performed with the digestive tract of 240 predators. The species that were highly selected were *S. serrulatus*, *D. gessneri*. The species with the lowest index of electivity was *D.* cf. *brevireme*, despite the greater abundance in the environment. Juveniles feed on more zooplankton species than adults, since zooplankton prey may be more difficult to manipulate by them. However, for gerrids, mainly due to their semi-aquatic way of life, it is suspected that part of their feeding comes from individuals trapped on the water surface or dead bodies, due to the difficulty of encounter between predator and plankton. For both gerrids and notonectids species, there is a higher selectivity for larger prey species, even when they are less frequent in the environment when compared to other species. It is believed that the preference for larger prey is related to the greater facility for detection and manipulation by the predator. The frequencies of biomarkers in the digestive tubes of *M. uruguayensis* were higher in the period with higher prey availability, because the higher the prey density in the environment the lower the time spent to locate and pursue them. Thus, it is concluded that the method used was successful in searching for prey DNA, and heteroptera could potentially influence zooplankton community structure in a tropical shallow lake.

Keywords: Trophic interactions; microcrustaceans; COI; PCR; tropical shallow lake.

3.1 Introdução

Historicamente, a influência de predadores invertebrados nos ecossistemas lênticos tem recebido menor atenção que os predadores vertebrados. Contudo muitos estudos têm apontado que eles são agentes importantes na estruturação de comunidades zooplanctônicas desses ecossistemas (Hall et al. 1970; Zaret 1980; Kerfoot e Sih 1987; Arner et al. 1998). Com base em estudos empíricos e teóricos, o tamanho do corpo, tanto de predadores quanto presas, parece ser um importante fator para determinar a estrutura da comunidade (Brooks e Dodson 1965; Brooks 1968; Hall et al. 1976; Warren e Lawton 1987; Cohen et al. 1993; Woodward e Hildrew 2002; Woodward et al. 2005). No entanto, há outros aspectos que podem influenciar o impacto e o padrão de seletividade de presas, como por exemplo o efeito conjunto das espécies de presas e predadores presentes no ambiente (Hanazato e Yasuno 1989); a densidade populacional dos predadores e presas, e a duração da pressão de predação (Eitam e Blaustein 2010); o comportamento de forrageamento e os mecanismos de defesa (Peckarsky 1982); e o estádio de desenvolvimento dos predadores (Castilho-Noll e Arcifa 2007; Domingos e Arcifa 2017a, 2017b).

Determinar a preferência alimentar de predadores diretamente no ambiente natural é altamente complexo, visto que a densidade e diversidade de presas disponíveis estão constantemente mudando ao longo do tempo e do espaço. Assim sendo, o que um predador consome em um determinado ambiente e em um determinado momento depende do que está disponível e acessível a ele (quantitativa e qualitativamente). Para predadores generalistas, obter informações sobre suas preferências alimentares e seus padrões de seletividade é um desafio ainda maior, e tem sido um dos grandes desafios dos estudos de cadeias tróficas.

Os insetos aquáticos conhecidos como notonectídeos (Heteroptera: Notonectidae) são predadores invertebrados que podem desempenhar um papel importante na estrutura e abundância de populações zooplanctônicas em vários ambientes de água doce (Nesbitt et al. 1996; Blaustein 1998; Hampton et al. 2000). Vários autores observaram em experimentos, que notonectídeos apresentam uma tendência em selecionar suas presas em função do tamanho, com preferência por espécies maiores, resultando em redução da densidade dessas espécies, em contrapartida beneficiando as espécies menores (Cooper 1983; Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Gilbert e Burns 1999; Gergs e Ratte 2009).

Gerrídeos (Heteroptera: Gerridae), diferentemente de notonectídeos, são insetos semi-aquáticos que habitam a película superficial da água, sendo extremamente adaptados para viver nesse hábitat, em relação a atividades como locomoção e alimentação (Andersen 1982;

Spence e Andersen 1994). São predadores generalistas (Cummins 1973; Peckarsky 1982), alimentando-se principalmente de artrópodes terrestres que caem sobre a película de tensão superficial da água e invertebrados aquáticos que mantêm algum grau de contato com a superfície da água (McLean 1990). Poucos estudos avaliaram o efeito da predação desse grupo sobre espécies zooplanctônicas (Domingos e Arcifa 2017b). Alguns autores argumentaram que apesar de eventualmente alguns indivíduos poderem capturar presas que habitam a coluna d'água (*e. g.*, zooplâncton), este talvez seja um evento raro, já que a presa precisa alcançar a película superficial para que o predador a capture (Fernando et al. 1990).

Apesar das grandes contribuições dos estudos que avaliaram aspectos da predação desses dois grupos de heterópteros sobre espécies zooplanctônicas, um fator importante a ser considerado é que grande parte dos estudos foi realizado em laboratório (Scott e Murdoch 1983; Blaustein 1998; Gilbert e Burns 1999; Hampton e Gilbert 2001; Domingos e Arcifa 2017a, 2017b) e containers a céu aberto (Blaustein et al. 1995; Blaustein 1998; Arner et al. 1998; Eitam e Blaustein 2010). Dessa maneira, é importante enfatizar que experimentos em laboratório nem sempre são capazes de simular totalmente a estrutura real do ecossistema. Então mesmo com o arcabouço desses trabalhos, há uma questão que surge: gerrídeos e notonectídeos alimentam-se de espécies zooplanctônicas no ambiente natural? Essa questão é justificada porque diferentemente dos ambientes "mimetizados" em experimentos, no ambiente natural existem todos os componentes do ecossistema presentes, inclusive toda gama de presas alternativas às presas zooplanctônicas que normalmente se encontram em um ecossistema lêntico; além da presença de refúgios para presas com a presença de macrófitas aquáticas, e toda complexidade estrutural e ecológica que dificilmente pode ser reproduzida em um experimento de laboratório. Desse modo, os experimentos em laboratório podem distorcer aspectos alimentares desses predadores quando comparado com sua alimentação no ambiente natural.

O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que, assim como nos experimentos de laboratório citados, gerrídeos e notonectídeos alimentam-se de espécies zooplanctônicas no ambiente natural. Além disso, foram avaliados alguns aspectos da predação desses predadores, respondendo as seguintes questões: (1) Foram detectados vestígios de DNA das presas no tubo digestório do insetos coletados no ambiente natural?; (2) Ocorreu diferença na proporção de presas detectadas no tubo digestório de insetos jovens e adultos?; (3) Foi detectada maior frequência de DNA das espécies de presas maiores nos tubos digestórios dos predadores?; (4) A frequência de presas encontradas nos tubos digestórios varia de acordo com a densidades de presas em diferentes estações? A análise foi feita por meio da detecção

do DNA das presas (biomarcadores desenvolvidos e testados previamente – Capítulo I) no tubo digestório dos predadores coletados diretamente no ambiente natural.

3.2 Material e Métodos

Para a detecção de vestígios de DNA das presas zooplanctônicas *Thermocyclops decipiens, Mesocyclops* sp., *Ceriodaphnia richardi, Daphnia gessneri, Diaphanosoma* cf. *brevireme* e *Simocephalus serrulatus* nos tubos digestórios dos heterópteros *Martarega uruguayensis* e *Rheumatobates crassifemur* foram efetuadas reações de PCR com extrações dos tubos digestórios dos predadores coletados no ambiente. Para as reações foram utilizados primers específicos capazes de amplificar exclusivamente os biomarcadores do gene COI das presas correspondentes ao primer.

3.2.1 Coleta, extração de DNA, amplificação e sequenciamento

As coletas para análise do tubo digestório dos insetos foram realizadas na zona litorânea (aproximadamente 1 m de profundidade), próximo à borda da macrófita enraizada, *Ludwigia* sp., em duas campanhas de coletas (período quente-chuvoso – início de abril de 2015) e (período frio-seco – início de agosto de 2015). Os heterópteros foram coletados com uma rede em "D" (malha 0,5 mm) e ajuda de um barco pequeno com motor elétrico. Foi estabelecido um transecto de 10 m na borda dos bancos de macrófitas, onde foram efetuadas as amostragens por meio de arrastos horizontais com a rede na superfície. Os espécimes de *R. crassifemur* e *M. uruguayensis* foram transferidos imediatamente para frascos contendo etanol 95%. Posteriormente, no laboratório, foram lavados com água destilada e separados em novos frascos com etanol de acordo com a espécie e estádios de desenvolvimento (jovens e adultos), sendo mantidos a -20 ºC até a extração do material genético do tubo digestório. Nas duas campanhas de coletas, o zooplâncton também foi coletado quantitativamente na borda das macrófitas aquáticas, com objetivo de avaliar a densidade e frequência relativa das eventuais presas no ambiente no mesmo período em que os predadores foram coletados. Para a amostragem das presas foi utilizada uma bomba de sucção (Jabsco ITT Ind., Costa Mesa, EUA) com capacidade de 30 L/min, bombeando-se um total de 90 L de água para cada réplica (3 no total). Uma mangueira acoplada à bomba foi utilizada para fazer a amostragem. A água foi filtrada através de uma rede de plâncton com malha de 60 µm. Os organismos zooplanctônicos coletados foram fixados conforme Haney e Hall (1973) e contados

utilizando-se um estereomicroscópico Olympus SZ 40 em sub amostras de 1 ml tiradas com uma pipeta de pistão. Após a contagem das réplicas foi calculada a densidade populacional e a frequência relativa de cada espécie de presa nos dois períodos de coleta.

Para extração do material genético do tubo digestório dos insetos, foi utilizado estereomicroscópico Olympus SZ 40 e instrumentos esterilizados e adequados para cortar e retirar as vísceras. Primeiramente foi realizada a remoção da cabeça seguida de incisões laterais ao longo do abdômen para dissecar o exoesqueleto e remover o tubo digestório. O conteúdo retirado foi armazenado em tubos de microcentrífuga para extração do DNA.

No total foram efetuadas 48 reações de PCR com o tubo digestório de 240 predadores (Tabela 3.1). Os primers específicos CrFw-79/CrRv-248, DgFw-195/DgRv-371, DbFw-216/DbRv-497, SsFw-327/SsRv-574, TdFw-45/TdRv-254, MsFw-351/MsRv-587 (Capítulo I) foram utilizados para amplificar fragmentos internos (~ 170 a 237 pb) do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI), que foram utilizados como biomarcadores das presas-alvo. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 0,1 a 50 ng de DNA ressuspenso, 1,2 M de Betaína, 200 M de cada dNTPs, 1,4 mM de $MgCl_2$, 1X Taq Buffer, 0,5 M de cada primer e 2U de Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well® (Applied Biosystems) com um primeiro ciclo de desnaturação a 95 °C durante 3 min, seguido por 37 ciclos a 94 °C durante 45s, 58-62 °C durante 45s, e 72 °C durante 15s a 24s dependendo do primer utilizado, uma vez que a temperatura de anelamento e o tamanho dos biomarcadores são diferentes entre eles. Por fim, foi realizado um último ciclo de extensão a 72 °C durante 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% com marcadores de 50 pb a 500 pb com incrementos de 50 pb. Os produtos positivos foram purificados com o Kit SureClean Plus® conforme recomendações sugeridas pelo fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados em ambas as direções em uma instalação de sequenciamento na Universidade Estadual de Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal.

Tabela 3.1 - Número de espécimes de predadores selecionados para reações de PCR com extrações dos tubos digestórios para detectar biomarcadores das presas a partir de seus primers específicos.

Predador	***M. uruguayensis***												***R. crassifemur***											
Estádio	**Jovens**						**Adultos**						**Jovens**						**Adultos**					
Primer	**Dg**	**Cr**	**Db**	**Ss**	**Ms**	**Td**	**Dg**	**Cr**	**Db**	**Ss**	**Ms**	**Td**	**Dg**	**Cr**	**Db**	**Ss**	**Ms**	**Td**	**Dg**	**Cr**	**Db**	**Ss**	**Ms**	**Td**
abril	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
agosto	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Dg: *Daphnia gessneri;* **Cr:** *Ceriodaphnia richardi;* **Db:** *Diaphanosoma* cf. *brevireme;* **Ss:** *Simocephalus serrulatus;* **Ms:** *Mesocyclops* sp.; **Td:** *Thermocyclops decipiens*

3.2.2 Análise dos dados

Para analisar se houve diferença entre a proporção de PCRs positivos e negativos (presença/ausência de biomarcadores das presas nos tubos digestórios dos predadores) entre os períodos de coleta (abril e agosto) e entre os estádios (adultos e jovens), foi realizado o "Fisher's exact test of Independence" ($p < 0,05$). Para comparar as densidades populacionais das espécies zooplanctônicas coletadas no ambiente nos dois períodos foi utilizado o teste T-student. O coeficiente de seletividade W_i (Chesson 1978; Vanderploeg e Scavia 1979; Cantanhêde et al. 2009) foi usado como uma medida matemática da preferência alimentar dos heterópteros e é calculado conforme a fórmula:

$$W_i = (r_i\, p_i^{-1})\ [\Sigma(r_i\, p_i^{-1})]^{-1}$$

onde r_i é a proporção da presa i na dieta do predador, e p_i é a proporção da presa i no ambiente. Para apresentação gráfica, o índice de eletividade relativa (E_i) foi adotado. Como resultado, tem a propriedade de indicar a preferência entre uma escala numérica de -1 (indicando rejeição ou inacessibilidade a um tipo de presa: menos frequente no tubo digestório, mas frequente no ambiente) a +1 (indicando seleção ativa do predador, mais frequente no tubo digestório, podendo ser raro no ambiente). E_i é definido como:

$$E_i = (W_i - m^{-1})\ (W_i + m^{-1})^{-1}$$

onde m é o número de espécies de presa. Os dados utilizados para calcular a seletividade alimentar foram baseados na composição relativa das espécies de presas no meio ambiente e nos tubos digestórios dos insetos a partir das análises moleculares. A proporção de presas no tubo digestório dos predadores foi estimada a partir da frequência de PCRs (+) em grupos de 5 indivíduos, conforme a tabela 3.1. Espécies que não foram encontradas no conteúdo do tubo digestório durante o estudo foram omitidos da análise. Com os valores dos índices de eletividade relativos obtidos para cada predador em diferentes períodos, foram feitas regressões lineares ($p<0,05$) em função do tamanho das presas, de modo a testar a hipótese de que há preferência dos predadores por presas maiores.

3.3 Resultados

Os dados referentes às densidades populacionais das espécies de microcrustáceos no ambiente natural coletadas nos dois períodos encontram-se na tabela 3.2. Houve diferenças significativas na comparação de densidades populacionais entre abril e agosto para todas as espécies de cladóceros, sendo que *D.* cf. *brevireme* e *S. serrulatus* foram mais abundantes em abril, enquanto que as espécies *C. richardi* e *D. gessneri* foram mais abundantes em agosto. Os copépodos *T. decipiens* e *Mesocyclops* sp. não apresentaram diferenças significativas em suas densidades populacionais entre abril e agosto. A densidade média total de todas as espécies foi maior em abril, com média 215,9 ind/L.

Tabela 3.2 - Comparação das médias ± EP (ind/L) das densidades populacionais das espécies de presas coletadas no ambiente natural nos períodos de abril e agosto de 2015. Teste T-student ($p < 0,05$).

	C. richardi	***D. brevireme***	***D. gessneri***	***S. serrulatus***	***T. decipiens***	***Mesocyclops* sp.**	***Total***
abril	0,87 ± 0,32	183, 93 ± 24,14	0,50 ± 0,25	2,23 ± 0,37	13,17 ± 4,70	15,27 ± 5,96	215, 93 ± 4,19
agosto	11,87 ± 3,3	1,23 ± 0,38	4,00 ± 0,17	0,67 ± 0,26	12,43 ± 1,96	14,77 ± 2,92	44, 97 ± 8,76
p	0,029	0,002	0,001	0,031	0,896	0,945	0,006

No total foram efetuadas 48 reações de PCR com o tubo digestório de 240 predadores. A tabela 3.3 exibe a proporção de tubos digestórios analisados que apontaram a presença de DNA de presas zooplanctônicas nos tubos digestórios de diferentes predadores em abril e agosto. Houve diferenças significativas ($p = 0,026$) no número de PCRs (+) entre indivíduos jovens (15+) e adultos (5+) de *M. uruguayensis,* ou seja, a frequência de biomarcadores das presas foi maior nos indivíduos jovens. Contudo, não houve diferenças significativas ($p = 0,825$) no número de PCRs (+) entre os indivíduos jovens (12+) e adultos (14+) de *R. crassifemur.* Em relação aos períodos de coleta, para *M. uruguayensis* houve diferenças significativas no número de PCRs (+) entre abril (15) e agosto (5), com maior frequência em abril ($p = 0,026$). Contudo, não houve diferença significativa para *R. crassifemur* ($p = 0,825$).

Tabela 3.3 - Proporção de PCRs positivos (+) e negativos (-) em relação ao estádio de desenvolvimento do predador e aos períodos de coleta.

	Jovem		Adulto		abril		agosto	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
M. uruguayensis	15	45	5	55	15	45	5	55
R. crassifemur	12	48	14	46	12	48	14	46

O padrão das fotografias de gel agarose analisadas com os produtos da PCR para detectar a amplificação dos biomarcadores estão exemplificados na Figura 3.1. Devido ao grande número de figuras geradas com as fotografias de gel agarose (48 PCRs), e com intuito de mostrar o padrão de amplificação e a forma como foram visualizados e interpretados os resultados das PCRs, foram apresentadas somente 6 fotografias, uma para cada primer. Contudo, todos os resultados dessas figuras estão apresentados na tabela 3.4. Nos exemplos citados, *M. uruguayensis* jovens coletados em abril apresentaram 3 bandas positivas nas linhas 2, 4 e 6 para biomarcadores de *S. serrulatus* (Figura. 3.1A); *M. uruguayensis* jovens coletados em abril apresentaram 3 bandas positivas nas linhas 3, 5 e 6 para biomarcadores de *Mesocyclops* (Figura 3.1B); *M. uruguayensis* adultos coletados em abril apresentaram uma banda positiva na linha 2 para biomarcador de *D. gessneri* (Figura 3.1C); *R. crassifemur* adultos coletados em agosto apresentaram 3 bandas positivas nas linhas 3, 4 e 5 para biomarcadores de *C. richardi* (Figura 3.1D); *R. crassifemur* adultos coletados em abril apresentaram duas bandas positivas nas linhas 3 e 4 para biomarcadores de *D.* cf. *brevireme* (Figura 3.1E); *M. uruguayensis* adultos coletados em abril apresentaram 1 banda positiva na linha 3 para biomarcador de *T. decipiens* (Figura 3.1F).

A tabela 3.4 mostra todas as PCRs realizadas, apontando resultados em relação aos predadores, períodos e presença/ausência de biomarcadores das presas. Dos 240 tubos digestórios analisados, 46 deles (19,2%) apresentaram resultados positivos para biomarcador de alguma das 6 espécies de presas-alvo, sendo que 27 (58,7%) em abril e 19 (41,3%) em agosto. Em relação às espécies de presas, a ordem decrescente de frequência de PCRs (+) foi: *S. serrulatus* com 14 (30,4%), *T. decipiens* 14 (30,4%), *D.* cf. *brevireme* 5 (10,9%), *C. richardi* 5 (10,9%), *D. gessneri* 4 (8,7%) e *Mesocyclops* sp. 4 (8,7%).

Figura 3.1 - Fotografias dos géis de agarose com os exemplos dos padrões das bandas positivas das PCR. **Linha 1**: marcador (500 pb); **Linhas 2 a 6:** extrações do tubo digestório de 5 indivíduos da mesma espécie; **Linha 7:** Controle positivo; **Linha 8:** Controle negativo. **(+)**: biomarcador da presa amplificado; **(-)**: biomarcador da presa não amplificado.

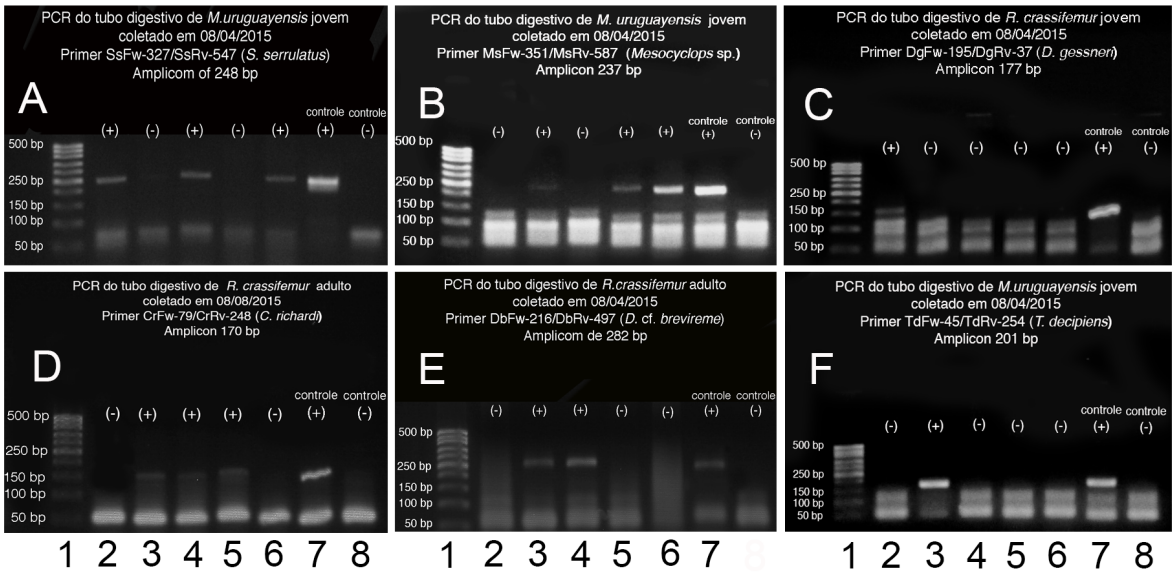


Tabela 3.4 - Proporção de PCRs positivos (+) e negativos (+) dos tubos digestórios dos predadores em relação às presas e períodos de coleta. **Dg**: *D. gessneri*; **Cr**: *C. richardi*; **Db**: *D.* cf. *brevireme*; **Ss**: *S. serrulatus*; **Ms**: *Mesocyclops* sp. e **Td**: *T. decipiens.*

			Dg		**Cr**		**Db**		**Ss**		**Ms**		**Td**	
Predador	**Estádio**	**Período**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**	**(+)**	**(-)**
M. uruguayensis	Jovem	abril	0	5	0	5	3	2	3	2	3	2	1	4
M. uruguayensis	Adulto	abril	1	4	1	4	0	5	2	3	0	5	1	4
R. crassifemur	Jovem	abril	1	4	0	5	0	5	5	0	0	5	0	5
R. crassifemur	Adulto	abril	0	5	0	5	2	3	0	5	1	4	3	2
M. uruguayensis	Jovem	agosto	2	3	1	4	0	5	0	5	0	5	2	3
M. uruguayensis	Adulto	agosto	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
R. crassifemur	Jovem	agosto	0	5	0	5	0	5	3	2	0	5	3	2
R. crassifemur	Adulto	agosto	0	5	3	2	0	5	1	4	0	5	4	1

O sequenciamento dos produtos positivos das reações de PCR evidenciou que os "amplicons" resultantes foram iguais às sequências do gene COI correspondentes às espécies de presas que foram testadas, o que provou a correta amplificação dos biomarcadores e identificação das presas em nível especifico (Figuras 3.2A a 3.2E). No exemplo citado, foi mostrado somente um alinhamento de cada uma das espécies de presas comparando-se a sequência do biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório do predador com a sequência do gene COI correspondente à espécie.

Figura 3.2A - Alinhamento com a sequência do gene COI de *T. decipiens* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                 10        20        30        40        50        60        70
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         ATAAACATATTGGTACTCTTTACCTAATTGCGGGTGTGTCAGCCGGCATCATTGGTACTGCACTAACAGT
Biomarcador - Primer Td45-254 ---------------------------------------------GCATCATTGGTACTGCACTAACAGT

                                 80        90       100       110       120       130       140
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         TATTATTCGTCTTCAATTAGGTCAACCAGGTTCTTTAATAGCACACCACCAAATTTACAATGTAGTGGTT
Biomarcador - Primer Td45-254 TATTATTCGTCTTCAATTAGGTCAACCAGGTTCTTTAATAGCACACCACCAAATTTACAATGTAGTGGTT

                                150       160       170       180       190       200       210
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         ACTGCTCATGCTTTTATTATAATCTTTTTTATGGTCATGCCTATTTTAATTGGTGGGTTTGGTAATTCAT
Biomarcador - Primer Td45-254 ACTGCTCATGCTTTTATTATAATCTTTTTTATGGTCATGCCTATTTTAATTGGTGGGTTTGGTAATTCAT

                                220       230       240       250       260       270       280
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         TAGTGCCATTAATAATTGGTTCTCCTCATATGGCTTTTCCTCGTATAAATAACATAACATTTTCATTTTT
Biomarcador - Primer Td45-254 TAGTGCCATTAATAATTGGTTCTCCTCATATGGCTTTTCCTCGT-------------------------

                                290       300       310       320       330       340       350
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         AATTCCTGCTTTCATTATATTATTAACTACATCCTTAGTACAAACAGGGGCAGGCACAGCATCAACAGTT
Biomarcador - Primer Td45-254 ------------------------------------------------------------------

                                360       370       380       390       400       410       420
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         TACCCCCCTTTAACAACAAATATTTCACATTCAGCATCCTCAGTTCATTACGCTATTTTTTCTCTTCATT
Biomarcador - Primer Td45-254 ------------------------------------------------------------------

                                430       440       450       460       470       480       490
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         TGGCAGCAGTTTCATCAATTTTAGGGGCAGTAAATTTTATTACAACTTTAGCAAATATACCAACATTGGG
Biomarcador - Primer Td45-254 ------------------------------------------------------------------

                                500       510       520       530       540       550       560
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         AATATTCTTACATCCAACTCCCTTATTTGCTTGGGCTGTGTTAATTACTGCTATTTTATTACTGCTCTCT
Biomarcador - Primer Td45-254 ------------------------------------------------------------------

                                570       580       590       600       610       620       630
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         CTTCCTGTCTTAGCGGGGCTATTACTATATTATTAACACATCGTAATTTAAATACTTCTTTTTATGACC
Biomarcador - Primer Td45-254 ------------------------------------------------------------------

                                640       650       660       670       680
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
T. decipiens COI         CTACAGGTGCAGGTCACCCAATTTTATACCAACATCTATTTTCATTTTTTG
Biomarcador - Primer Td45-254 ---------------------------------------------
```

Figura 3.2B - Alinhamento com a sequência do gene COI de *C. richardi* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                 10        20        30        40        50        60        70
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          ATAAACATATTGGCACTTTATATTTTATTTTTGCAGTTTCATCAGGCATGGTAGCAACTGCCTTAAGTAT
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                 80        90       100       110       120       130       140
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          ACTAATTCGTGCCCAATTAGGTCAGTCAGGTAGTCTTATTGGTCATCATCAAATTTATAATGTAATTGTT
Biomarcador-Primer Cr79-248 --------GTGCCCAATTAGGTCAGTCAGGTAGTCTTATTGGTCATCATCAAATTTATAATGTAATTGTT

                                150       160       170       180       190       200       210
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          ACTGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTCTTCATGGTTATGCCCATCATAATTGCAGCATTTGCAAATTCAC
Biomarcador-Primer Cr79-248 ACTGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTCTTCATGGTTATGCCCATCATAATTGCAGCATTTGCAAATTCAC

                                220       230       240       250       260       270       280
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          TAGTCCCTCTCATACTAGGTGCTCCTCATATAGCGTTCCCTCCATTCAATAATTTAAGTTTTTCACTTCT
Biomarcador-Primer Cr79-248 TAGTCCCTCTCATACTAGGTGCTCCTCATATAGCGTTCC------------------------------

                                290       300       310       320       330       340       350
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          TCCTCCCGCACTTACTCTTCTTTTAGTAGGGGCAGCTGTAGAAAGTGCAGCTGGTACAGCATCAACTGTT
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                360       370       380       390       400       410       420
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          TACCCTCCCTTATCAGCAGGTATTGCTCATGCTGGGGCATCAGTAGATCTCAGAATTTTTTCTTTACATT
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                430       440       450       460       470       480       490
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          TAGCTGCAATTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTAAATTTTATTACTACTATCATTAACATACGTTCTCAAGG
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                500       510       520       530       540       550       560
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          AATAACACTTCATCCAATTCCTTTGTTTGTTTGGGCTGTAGGCATTACTGCACTCTTACTTTTACTTAGT
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                570       580       590       600       610       620       630
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          TTGCCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATGTTATTAACTCATCGCAATTTAAATACTTCTTTTTTCCACC
Biomarcador-Primer Cr79-248 ------------------------------------------------------------------

                                640       650       660       670
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|
C. richardi COI          CTGCGGCAGGGGGGCATCCCATTTTATACCAACATCTTTTTTCA
Biomarcador-Primer Cr79-248 ---------------------------------------------
```

Figura 3.2C - Alinhamento com a sequência do gene COI de *Mesocyclops* sp. e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                   10        20        30        40        50        60        70
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TGGTCAACAAATCATAAACATATTGCAACTTTATATTTATTAGCCGGGGCTTCATCAGCAATCATTGCAA
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                                   80        90       100       110       120       130       140
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       CTGGCCTTAGGGTTATTATTCGTCTACAGCTAGCACAGCCTGGTTCTTTTATAGGCCATGATCACATCTA
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                                  150       160       170       180       190       200       210
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TAACGTGGTAGTAACAGCCCATGCCTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTTATGCCTATTTTAATTGGTGGG
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                                  220       230       240       250       260       270       280
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TTCGCAAATTGGTTAGTCCCCTTAATACTAGGGTCACCTGACATAGCTTTTCCACCAATAAATAATATAA
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                                  290       300       310       320       330       340       350
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       GGTTTTCATTTTTAGTGCCTGCACTTATTATACTTTTAACTACATCATTAGTACAAAGTGGTGCTGGCAC
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                                  360       370       380       390       400       410       420
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       AGGTTCAACAGTTTATCCTCCTCTTACAACAAATATTTCTCATTCTGGCTCTTCGGTTCATTACGCAATT
Biomarcador Primer Ms351-587 AGGTTCAACAGTTTATCCTCCTCTTACAACAAATATTTCTCATTCTGGCTCTTCGGTTCATTACGCAATT

                                  430       440       450       460       470       480       490
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TTTTCCTTACATTTAGCGGGGGTTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTAAATTTTATTACAACTGTGGGCAACA
Biomarcador Primer Ms351-587 TTTTCCTTACATTTAGCGGGGGTTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTAAATTTTATTACAACTGTGGGCAACA

                                  500       510       520       530       540       550       560
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TACCAACCTTTGCAGTTTTTTTACATCGTGTGCCTTTATTTGCTTGGGCTGTATTAATTACAGCTATTTT
Biomarcador Primer Ms351-587 TACCAACCTTTGCAGTTTTTTTACATCGTGTGCCTTTATTTGCTTGGGCTGTATTAATTACAGCTATTTT

                                  570       580       590       600       610       620       630
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       ATTGCTTTTGTCTCTTCCAGTATTGGCCGGGGCTATTACTATATTATTAACACATCGCAACCTAAATACC
Biomarcador Primer Ms351-587 ATTGCTTTTGTCTCTTCCAGTATTGGC-----------------------------------------

                                  640       650       660       670       680       690       700
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mesocyclops sp. COI       TCTTTTTATCACCCCACAGCAGCAGCACACCCTATTCTATATCAACATTTGTTTTCATTTTTTGGTCACC
Biomarcador Primer Ms351-587 ------------------------------------------------------------------

                          .
Mesocyclops sp. COI       C
Biomarcador Primer Ms351-587 -
```

Figura 3.2D - Alinhamento com a sequência do gene COI de *D. gessneri* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                  10        20        30        40        50        60        70
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   GATATTGCAACTTTGTATTTTATTTTTGCAATCTGGTCAGCAATAGTAGCAACTGCTCTTAGCCTTCTTA
Biomarcador-Primer Dg195-371      ------------------------------------------------------------------

                                  80        90       100       110       120       130       140
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   TCCCAGCACAACTTGCACAATCAGCAAGTTTAATTGGGCATCACCAAATCTATAATGTAATTGTAACTGC
Biomarcador-Primer Dg195-371      ------------------------------------------------------------------

                                 150       160       170       180       190       200       210
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   TCATGCATTTGTAATAATTTTTTTTATAGTTATGCCAATTATCATTGGGGCATTCGCAAATTGGCTAGTC
Biomarcador-Primer Dg195-371      ---------------------------------------------------TCGCAAATTGGCTAGTC

                                 220       230       240       250       260       270       280
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   CCTTTAATGCTTGGGGCCCCTGATATAGCTTTCCCTCCATTAAATAATTTAAGTTTTTCACTTCTTCCAC
Biomarcador-Primer Dg195-371      CCTTTAATGCTTGGGGCCCCTGATATAGCTTTCCCTCCATTAAATAATTTAAGTTTTTCACTTCTTCCAC

                                 290       300       310       320       330       340       350
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   CTGCTCTAACACTCTTACTAGTAGGGGCAGCTGTACAAACAGCAGCAGCAACAGCATCAACAGTGTACCC
Biomarcador-Primer Dg195-371      CTGCTCTAACACTCTTACTAGTAGGGGCAGCTGTACAAACAGCAGCAGCAACAGCATCAACAGTGTACCC

                                 360       370       380       390       400       410       420
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   TCCTCTTTCTGCTGGTATCGCTCATGCAGCAGCATCTGTTCATCTAAGTATTTTCTCCTTACACTTAGCG
Biomarcador-Primer Dg195-371      TCCTCTTTCTGCTGGTATCGCTCATGCAGCAGCATCTGTTCATCTA------------------------

                                 430       440       450       460       470       480       490
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   GGTATTTCTTCCATTTTGGGGGCTGTTAATTTTATTACTACAATTATTAATATACCATCCTCAGCAATAA
Biomarcador-Primer Dg195-371      ------------------------------------------------------------------

                                 500       510       520       530       540       550       560
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   CTCTTGATCCAATCCCTCTTTTTGTTTGGGCTGTTGCAATTACTGCTCTTCTTTTACTTTTAAGTTTACC
Biomarcador-Primer Dg195-371      ------------------------------------------------------------------

                                 570       580       590       600       610       620       630
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   TGTGTTAGCTGGGGCAATTACTATGCTCCTAACACATCGTAATTTAAACACTTCATTTTTTCATCCTGCA
Biomarcador-Primer Dg195-371      ------------------------------------------------------------------

                                 640       650       660       670
                                  ....|....|....|....|....|....|....|
D. gessneri COI                   GCAGGGGCACATCCAATCCTATACCAACACCTATTTTCATTTTTTG
Biomarcador-Primer Dg195-371      ----------------------------------------------
```

Figura 3.2E - Alinhamento com a sequência do gene COI de *S. serrulatus* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                   10        20        30        40        50        60        70
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         AAACATATTGGCACTTTGTACTTTATTTTTGGGGTCTCATCTGCAATAGTAGCAACTGCCTTAAGTATAC
Biomarcador-Primer Ss327-574 ------------------------------------------------------------------

                                   80        90       100       110       120       130       140
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         TTATTCGTGCACAGCTTGCACAATCAGCAAGCTTAATTGGTCATCATCAAATTTACAATGTAATTGTAAC
Biomarcador-Primer Ss327-574 ------------------------------------------------------------------

                                  150       160       170       180       190       200       210
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         TGCTCATGCTTTTGTTATCATTTTTTTTATAGTTATGCCAATTATAATTGGGGGGTTTGCAAATTCACTT
Biomarcador-Primer Ss327-574 ------------------------------------------------------------------

                                  220       230       240       250       260       270       280
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         GTCCCCTTAATGTTGGGGGCCCCACATATGGCATTCCCACGTTTAAACAACTTAAGTTTTTCACTTTTAC
Biomarcador-Primer Ss327-574 ------------------------------------------------------------------

                                  290       300       310       320       330       340       350
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         CCCCTGCATTAACTCTTCTTTTGGTTGGGGGTGCTGTACAAAGTGGGGCTGGCACAGCATGCACAGTTTA
Biomarcador-Primer Ss327-574 ---------------------------------------------GGGCTGGCACAGCATGCACAGTTTA

                                  360       370       380       390       400       410       420
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         TCCCCCTCTCTCAGCTGCAATTGCTCATGCCGGGGCTTCTGTTCATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTG
Biomarcador-Primer Ss327-574 TCCCCCTCTCTCAGCTGCAATTGCTCATGCCGGGGCTTCTGTTCATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTG

                                  430       440       450       460       470       480       490
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         GCTGGCATTTCTTCTATTTTAGGTGCAGTAAATTTTATTACTACTATTATTAATATACGTTCACAGGCAA
Biomarcador-Primer Ss327-574 GCTGGCATTTCTTCTATTTTAGGTGCAGTAAATTTTATTACTACTATTATTAATATACGTTCACAGGCAA

                                  500       510       520       530       540       550       560
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         TAACATTACACCCAATTCCGTTATTTGTGTGGGCTGTTGGTATCACAGCTCTTCTTTTATTACTCAGTCT
Biomarcador-Primer Ss327-574 TAACATTACACCCAATTCCGTTATTTGTGTGGGCTGTTGGTATCACAGCTCTTCTTTTATTACTCAGTCT

                                  570       580       590       600       610       620       630
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         TCCTGTTTTGGCAGGGGCTATTACTATACTGCTAACTCATCCAAATTTAAATACCTCATTCTTTCACCCT
Biomarcador-Primer Ss327-574 TCCTGTTTTGGCA-----------------------------------------------------

                                  640       650       660       670       680
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
S. serrulatus COI         GCAGGTGGGGGGCATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTCATTTTTTGGTCACC
Biomarcador-Primer Ss327-574 -------------------------------------------------------
```

Figura 3.2F - Alinhamento com a sequência do gene COI de *D.* cf. *brevireme* e o biomarcador amplificado e sequenciado a partir do tubo digestório dos predadores.

```
                                  10        20        30        40        50        60        70
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          TAAAGATATTGGCACACTTTATTTTATTTTTGCAGTTTCATCTGCAATAGTAGCAACAGCACTTACAATA
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------------------------------------------------------------------

                                  80        90       100       110       120       130       140
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          CTCATTCCAGCCCAACTAGGACAATGCGGCACACTCATTGCACACCATCAAATCTACAATGTCATTGTTA
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------------------------------------------------------------------

                                 150       160       170       180       190       200       210
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          CCGCACACGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATGGTTATACCAATTTTAATTGCAGCATTTGCAAATTCATT
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------------------------------------------------------------------

                                 220       230       240       250       260       270       280
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          GGTCCCCCTCATACTAGCAGCACCAGACATGGCTTTCCCTCCACTCAACAACTTAACATTCTCACTTCTT
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------CCTCATACTAGCAGCACCAGACATGGCTTTCCCTCCACTCAACAACTTAACATTCTCACTTCTT

                                 290       300       310       320       330       340       350
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          CCTCCCTCACTTACTCTGCTCCTTGTAGCAACAGCTGTTCAAGCAGGGGCGGCAACAGCATCAACAGTAT
Biomarcador-Primer DbF216-497 CCTCCCTCACTTACTCTGCTCCTTGTAGCAACAGCTGTTCAAGCAGGGGCGGCAACAGCATCAACAGTAT

                                 360       370       380       390       400       410       420
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          ACCCACCTCTTTCAGGTCCCATCGCTCACGCTGGCGCTGCTGTTCATTTAAGTATTTTTTCCCTTCACTT
Biomarcador-Primer DbF216-497 ACCCACCTCTTTCAGGTCCCATCGCTCACGCTGGCGCTGCTGTTCATTTAAGTATTTTTTCCCTTCACTT

                                 430       440       450       460       470       480       490
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          AGCAGCAATTTCTTCTATTTTAGCAGCGGTAAACTTTATTACTACAATTATAAACATACCATCTCAAGGT
Biomarcador-Primer DbF216-497 AGCAGCAATTTCTTCTATTTTAGCAGCGGTAAACTTTATTACTACAATTATAAACATACCATCTCAAGGT

                                 500       510       520       530       540       550       560
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          ATAACCCTTCATCCAATCCCCCTTTTTGCATCAGCTGTAGCAATTACCGCACTCCTTTTACTTCTCACAC
Biomarcador-Primer DbF216-497 ATAACCC------------------------------------------------------------

                                 570       580       590       600       610       620       630
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D. brevireme COI          TCCCAGTCTTAGCTGCAGCTATTACTATACTACTTACACATCCAAATTTAAATACCTCTTTCTTCCACCC
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------------------------------------------------------------------

                                 640       650       660       670       680
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
D. brevireme COI          AGCTGCAGGTGGTCATCCAATTCTTTATCAACATCTATTTTCATTTTTTGGTCACC
Biomarcador-Primer DbF216-497 ------------------------------------------------------
```

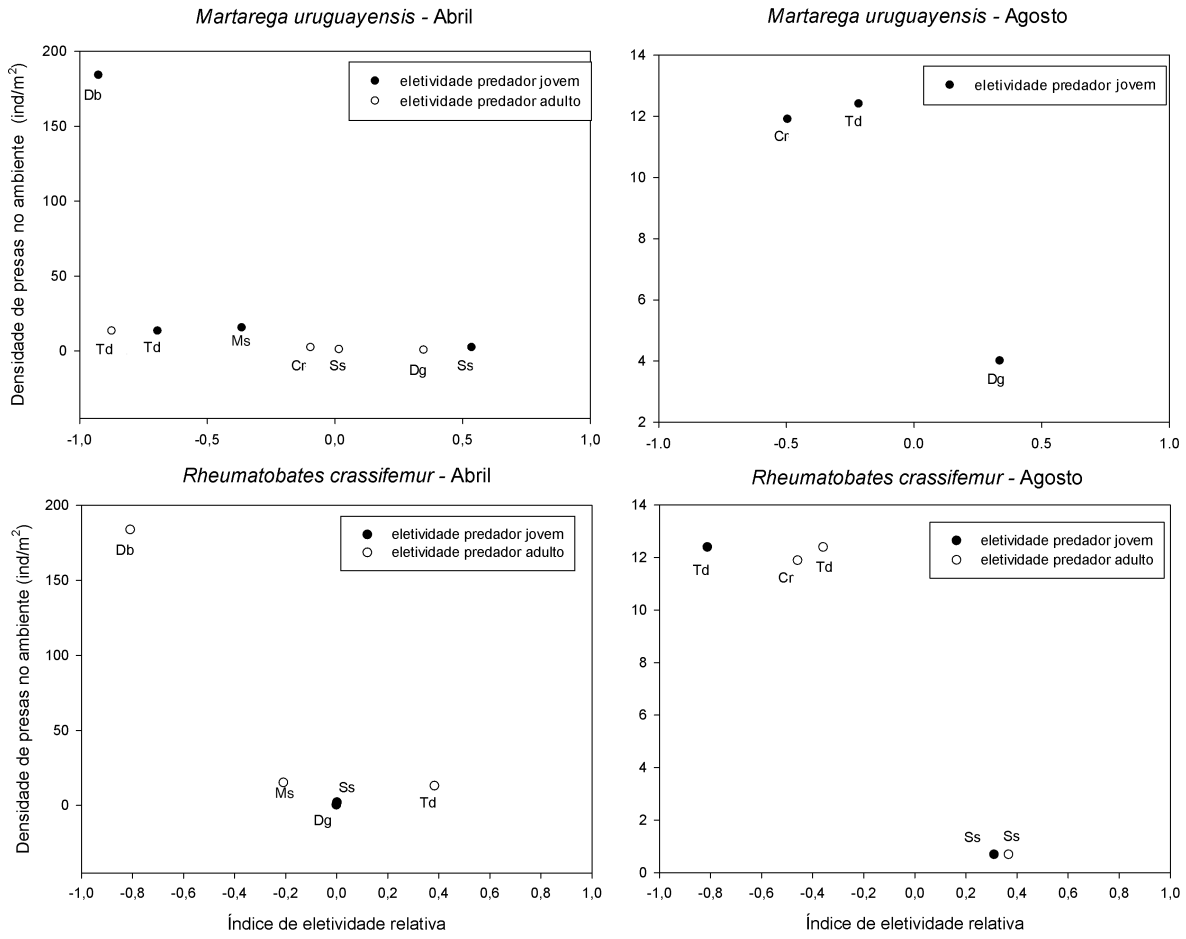
A partir dos valores da tabela 3.5 foram calculados os valores dos índices de eletividade relativa (E_i). No geral, as espécies que apresentaram índices positivos, o que indica uma seleção ativa do predador, sendo mais frequente no tubo digestório, mesmo quando raras no ambiente, foram *S. serrulatus* e *D. gessneri*, ou seja, para ambos os predadores essas duas presas são selecionadas mais ativamente, exceto para o gerrídeo em abril, que apresentou um índice próximo de zero, enquanto que a presa mais selecionada foi o copépodo *T. decipiens* (Figura 3.3). As presas menores como *D.* cf. *brevireme, C. richardi,*

Mesocyclops sp. e *T. decipiens* apresentaram índices de eletividade negativos em sua maioria, indicando rejeição ou inacessibilidade a esse tipo de presa, sendo menos frequente no tubo digestório, mesmo que eventualmente mais frequente no ambiente, ou seja, apesar de serem encontrados vestígios de seu DNA no tubo digestório dos predadores, a preferência por essas presas, de acordo com o índice é menor. A espécie que teve a menor eletividade foi *D.* cf. *brevireme*, ainda que em maior abundância no ambiente em abril (Figura 3.3).

Tabela 3.5 - Valores de frequência relativa das espécies de presas no ambiente e no tubo digestório dos predadores nos períodos de abril e agosto de 2015.

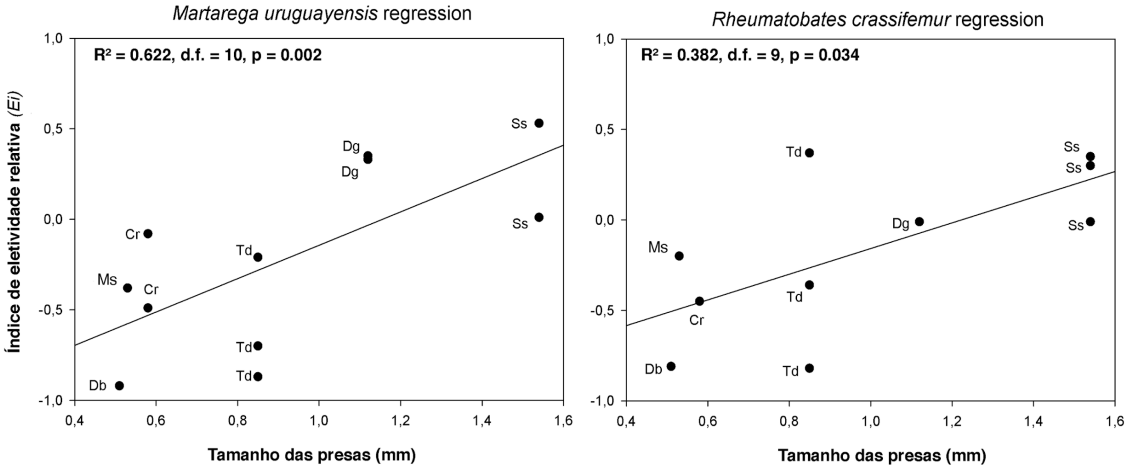
Espécies	***Tamanho médio da presa* (mm)**	**abril**		**agosto**	
		% dieta do predador	***% ambiente***	***% dieta do predador***	***% ambiente***
Predador - *Martarega uruguayensis* jovem					
Ceriodaphnia richardi (Cr)	0,85	-	0,4	20	26,4
Daphnia gessneri (Dg)	1,20	-	0,2	40	8,9
Diaphanosoma cf. *brevireme* (Db)	0,51	30	86,1	-	2,8
Simocephalus serrulatus (Ss)	1,54	30	0,1	-	1,5
Thermocyclops decipiens (Td)	0,58	10	6,1	40	27,7
Mesocyclops sp. (Ms)	0,53	30	7,1	-	32,8
Predador - *Martarega uruguayensis* adulto					
Ceriodaphnia richardi (Cr)	0,85	20	0,4	-	26,4
Daphnia gessneri (Dg)	1,20	20	0,2	-	8,9
Diaphanosoma cf. *brevireme* (Db)	0,51	-	86,1	-	2,8
Simocephalus serrulatus (Ss)	1,54	40	0,1	-	1,5
Thermocyclops decipiens (Td)	0,58	20	6,1	-	27,7
Mesocyclops sp. (Ms)	0,53	-	7,1	-	32,8
Predador - *Rheumatobates crassifemur* jovem					
Ceriodaphnia richardi (Cr)	0,85	-	0,4	-	26,4
Daphnia gessneri (Dg)	1,20	16,7	0,2	-	8,9
Diaphanosoma cf. *brevireme* (Db)	0,51	-	86,1	-	2,8
Simocephalus serrulatus (Ss)	1,54	83,3	0,1	50	1,5
Thermocyclops decipiens (Td)	0,58	-	6,1	50	27,7
Mesocyclops sp. (Ms)	0,53	-	7,1	-	32,8
Predador - *Rheumatobates crassifemur* adulto					
Ceriodaphnia richardi (Cr)	0,85	-	0,4	37,5	26,4
Daphnia gessneri (Dg)	1,20	-	0,2	-	8,9
Diaphanosoma cf. *brevireme* (Db)	0,51	33	86,1	-	2,8
Simocephalus serrulatus (Ss)	1,54	-	0,1	12,5	1,5
Thermocyclops decipiens (Td)	0,58	50	6,1	50	27,7
Mesocyclops sp. (Ms)	0,53	17	7,1	-	32,8

Figura 3.3 - Índices de eletividade relativa (E_i) dos predadores *M. uruguayensis* e *R. crassifemur* jovens e adultos em relação às presas e aos períodos de coleta.



Tanto *M. uruguayensis* (R^2 = 0,622, d.f. = 10, p = 0,002), quanto *R. crassifemur* (R^2 = 0,382, d.f. = 9, p = 0,034) apresentaram uma correlação positiva entre os índices de eletividade relativa (E_i) e o tamanho das presas (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Regressão linear do índice de eletividade relativa em função do tamanho médio das presas zooplanctônicas.



3.4 Discussão

Foram detectados vestígios de DNA de presas zooplanctônicas no tubo digestório dos insetos coletados no ambiente. Esse resultado acentua a efetividade do método de detecção baseado na amplificação de biomarcadores por PCR com primers específicos das presas a partir de amostras do conteúdo do tubo digestório dos predadores retirados do ambiente. A técnica em questão aprimora os estudos de cadeias tróficas onde é difícil a obtenção de dados por "vias tradicionais". Entende-se por "vias tradicionais" a observação visual da dieta de determinado predador, ou pelo exame microscópico do conteúdo do tubo digestório ou de suas fezes. Embora essas abordagens de observação visual forneçam informações úteis, elas impedem o a observação em determinadas ocasiões, por exemplo onde a maioria das espécies é noturna. Há também os casos de predadores que vivem abaixo do solo ou na água. O exame microscópico também tem grandes limitações, pois é um trabalho intensivo e depende muito das habilidades da pessoa que identifica os fragmentos das espécies semi-digeridas (Moreby 1988). Além disso, ele impede o estudo da dieta das espécies que realizam digestão extra-oral (*e. g.* heterópteros).

O método adotado a partir da utilização de primers específicos capazes de amplificar exclusivamente biomarcadores das presas por meio da PCR (Palumbi et al. 1991; Palumbi 1996), é um conceito sedimentado e baseia-se no pressuposto de que o DNA de organismos consumidos não será totalmente degradado durante a digestão, consequentemente podendo ser alvo do primer correspondente da espécie. Vários estudos sobre dieta e interações tróficas têm adotado esse método ou variantes semelhantes (Agustí et al. 1999; Asahida et al. 1997; Zaidi

et al. 1999; Hoogendoorn e Heimpel 2001; Jarman et al. 2002; Greenstone e Shufran 2003, Agustí et al. 2003a, 2003b; Blankenship e Yayanos 2005; Vestheim et al. 2005; Kuusk e Agustí 2008; Vestheim e Jarman 2008; Töbe et al. 2010; King et al. 2010). Contudo somente Vestheim et al. (2005), Vestheim e Jarman (2008) e Töbe et al. (2010) contemplaram espécies zooplanctônicas. Além dessa técnica, há uma variedade muito grande de técnicas moleculares que podem ser adotadas (Symondson 2002; King et al. 2010; Pompanon et al. 2012; Piñol et al. 2014), especialmente as que utilizam os novos sequenciadores chamados de nova geração ("Next Generation Sequence" - NGS) que têm uma capacidade enorme de processamento de sequências (Metzker 2010). Essa tecnologia vem sendo aplicada em estudos ecológicos de comunidades e cadeias tróficas onde se avalia efeitos de múltiplas variáveis e interações em uma rede trófica, e também em estudos de diversidade biológica com amostras ambientais (Pompanon et al. 2012; Shokralla et al. 2012), que podem gerar uma quantidade enorme de dados. Atualmente, apesar de ser viável, não é considerado prático, ou econômico, realizar esses tipos de estudo com reações de PCR com primers específicos de cada uma das possíveis presas para centenas de possíveis predadores individuais, visto que seriam necessárias centenas ou milhares de reações. Assim sendo, a técnica que utiliza NGS é ideal nesses casos. A técnica adotada neste trabalho, apesar de não ser tão efetiva quanto a NGS ainda é uma ferramenta de detecção de baixo custo, capaz de identificar presas ao nível de espécie (Hajibabaei et al. 2006), sendo relativamente rápida e precisa para estudar a dieta de predadores em ambientes naturais onde há um conhecimento *a priori* da dieta do predador em potencial. Domingos e Arcifa (2017a, 2017b) já haviam demonstrado que *R. crassifemur* e *M. uruguayensis* eram potenciais predadores de espécies zooplanctônicas em experimentos laboratoriais. Além disso, o ecossistema alvo apresenta uma diversidade relativamente baixa de espécies planctônicas (Arcifa *et al.* 1992; Arcifa et al. 2015), fazendo com que o método adotado fosse uma alternativa viável pelo fato do foco principal ser a predação de *R. crassifemur* e *M. uruguayensis* sobre a comunidade zooplanctônica do Lago Monte Alegre, o que gerou um baixo número de espécies de presas potenciais e, consequentemente, baixo número de reações de PCR.

Predadores jovens de *M. uruguayensis* apresentaram maior frequência de biomarcadores das espécies zooplanctônicas quando comparados aos indivíduos adultos. A maior pressão de predação de notonectídeos jovens comparando-se com adultos também foi evidenciada em experimentos de laboratório (Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Murdoch et al. 1984; Domingos e Arcifa 2017a). Esses resultados foram divergentes de Gilbert e Burns (1999), onde estádios maiores predaram mais cladóceros do que os menores.

No entanto, notonectídeos adultos podem não ser adaptados morfologicamente para se alimentar de presas muito pequenas devido à dificuldade de captura e manipulação (Ellis e Borden 1970). Assim, é provável que tenham maior facilidade em capturar presas maiores, como espécies zooplanctônicas maiores, insetos terrestres que eventualmente caiam na superfície da água, insetos aquáticos e larvas de diversos grupos (Cleto-Filho e Arcifa 2006; Quiroz-Martínez e Rodríguez-Castro 2007; Fischer et al. 2012). Sendo assim, ainda que houve ocorrências de biomarcadores das presas no tubo digestório de insetos adultos, a captura de microcrustáceos de pequeno porte por eles pode não valer o gasto energético com o ataque, já que há dificuldades de detecção e manuseio da presa, assim como o menor teor nutricional. Já para os gerrídeos, os resultados das análises dos tubos digestórios não demonstraram diferenças entre a proporção de PCRs (+) entre predadores jovens e adultos. Domingos e Arcifa (2017b) também mostraram em experimentos de laboratório que não houve essa diferença de predação entre indivíduos jovens e adultos para presas grandes como *Daphnia,* embora tenha havido para presas pequenas como *Ceriodaphnia.* A conclusão de Domingos e Arcifa (2017b) foi de que o gerrídeo adulto não consumia *Ceriodaphnia* porque o intervalo de tamanho da presa oferecido era apropriado para os jovens (1,80 mm), mas muito pequeno para os adultos (3,01 mm). Enquanto que *Daphnia* (1,20 mm), sendo bem maior que *Ceriodaphnia* (0,85 mm), era apropriada. Contudo, observou-se nos resultados da tabela 3.4 que os únicos PCRs (+) de biomarcadores de *Ceriodaphnia* foram obtidos a partir de tubos digestórios de gerrídeos adultos coletados em agosto. Isso diverge da hipótese de Domingos e Arcifa (2017b), já que era esperado que indivíduos jovens de *R. crassifemur* tivessem maior frequência de PCR (+) de *Ceriodaphnia* que os indivíduos adultos.

O fato é que os gerrídeos, diferentemente dos notonectídeos, são insetos semi-aquáticos, ou seja, vivem na superfície da coluna d'água, mas não dentro da mesma. Sendo assim, para que ocorra a predação, é necessário que as presas planctônicas alcancem a película superficial para que o ataque do predador ocorra, condição essa que já foi testada e comprovada anteriormente por Domingos e Arcifa (2017b). No ambiente natural a dinâmica das presas é bem diferente que em um recipiente com 500 ml de água. No ambiente natural, há menor chance de as presas chegarem à superfície voluntariamente, principalmente devido à temperatura mais elevada pela incidência do sol, o efeito de turbulência da superfície do lago, ao efeito nocivo de raios U.V e predadores existentes no ambiente (Rhode et al. 2001; Williamson et al. 2011). Consequentemente, esse menor contato das presas com a superfície dificulta o contato com um predador semi-aquático, e assim o ataque. O que pode ocorrer é que essas presas eventualmente podem alcançar a superfície, devido à supersaturação de

oxigênio, quando bolhas do gás podem se prender à carapaça dos microcrustáceos fazendo com que eles flutuem e alcancem o estrato superficial e dessa forma morram, tornando-se vulneráveis a esses predadores semi-aquáticos (Lampert e Sommer 2007). Neste caso, tanto predadores jovens quanto adultos não têm resistência da presa contra a predação, já que estão mortas ou presas à superfície incapazes de locomover-se, fazendo com que a manipulação seja muito mais fácil para o predador. Isso pode explicar o resultado de não ter ocorrido diferença na proporção de PCRs (+) entre predadores jovens e adultos, pois a presa estando na superfície estará disponível tanto para os gerrídeos adultos quanto para os jovens, já que não há resistência da mesma. Contudo não é possível confirmar se esta hipótese levantada é verdadeira utilizando-se apenas da técnica molecular empregada, pois é praticamente impossível definir se esses vestígios de DNA das presas foram provenientes de indivíduos vivos predados ativamente, ou seja, presas que alcançaram o estrato superficial da água e foram predadas, ou se foram provenientes de indivíduos mortos (Foltan et al. 2005; Juen e Traugott 2005; King et al. 2008). O fato de um predador ter vestígios de DNA de uma presa em seu tubo digestório não significa necessariamente que ele a matou, visto que este método não pode atualmente distinguir essas duas formas de ingestão de presas, apesar de que a disponibilidade de zooplâncton morto ser bem menor que de presas vivas (Dubovskaya, et al. 2007).

A predação seletiva ocorre quando há diferença entre frequências relativas de espécies ou tamanhos de presas na dieta do predador em relação àquelas que ocorrem no ambiente (Chesson 1978). Em muitos casos, a natureza da seleção da dieta é determinada não pelo comportamento de escolha ativa do predador, mas estritamente pela relativa vulnerabilidade ou disponibilidade dos itens alimentares (Ware 1972). Por exemplo, o zooplâncton de maior tamanho é detectado mais facilmente por predadores visualmente orientados, sendo que a distância mínima para o ataque do predador está positivamente relacionada ao tamanho da presa. Consequentemente, mesmo quando presas de diversos tamanhos são detectadas, a frequência de captura de itens grandes é desproporcionalmente maior em comparação com a abundância relativa no ambiente (Ware 1972). Ou seja, mesmo em densidades menores que outras presas, as presas maiores serão mais frequentemente escolhidas. Esta ideia levou à generalização de que alguns invertebrados aquáticos são predadores seletivos pelo tamanho das presas (Zaret 1980), como por exemplo os heterópteros abordados neste estudo (Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Gilbert e Burns 1999; Domingos e Arcifa 2017b). Os resultados suportam a hipótese de que os predadores têm preferência por espécies zooplanctônicas maiores, uma vez que houve uma correlação positiva significativa entre o

índice de eletividade relativo dos predadores e o tamanho das presas. Então, mesmo algumas presas sendo extremamente abundantes no ambiente em determinado período, como por exemplo *D.* cf. *brevireme* em abril, e ainda que PCRs (+) tenha ocorrido, a proporção de (+) quando comparado com espécies menos abundantes foi menor, o que diminui significativamente o valor do índice de eletividade relativa. Já no período quando a densidade populacional de *D.* cf. *brevireme* era menor (agosto), nenhum vestígio dessa presa foi detectado nos estômagos dos predadores. Já as espécies que apresentaram os maiores índices de eletividade (*e.g., S. serrulatus* e *D. gessneri)*, ainda que presentes em densidades relativamente baixas (0,50 a 4,00 ind/L), comparando-se por exemplo com os copépodos (12,4 a 15,3 ind/L) e *C. richardi* em agosto (11,9 ind/L) (Tabela 3.2), apresentaram índices de eletividade relativa superiores (Figura 3.3). Esses resultados corroboram com a hipótese de que o tamanho do zooplâncton é um dos fatores que determinam a seletividade dos predadores em ecossistemas lênticos (Ware 1972; Zaret 1980; Brooks e Dodson 1965). Vale ressaltar que para os gerrídeos, mesmo que a hipótese de que parte de sua alimentação seja obtida a partir de indivíduos que estão mortos ou presos à película superficial da água seja verdadeira, ainda assim há uma maior facilidade para detecção desses indivíduos quando são maiores.

Apesar de terem ocorrido diferenças nas densidades das espécies de presas entre abril e agosto, algumas mais abundantes em abril (*e. g. D.* cf. *brevireme* e *S. serrulatus*), e outras mais abundantes em agosto (*e. g.*, *C. richardi* e *D. gessneri*), a densidade total foi maior em abril. Os resultados deste trabalho não diferem dos padrões encontrados no histórico do Lago Monte Alegre (Arcifa et al. 1992; Arcifa et al. 2015; Ferreira et al. 2018). No entanto, esta elevada média em abril (215,9 ind/L) em relação a agosto (44,9 ind/L), está claramente influenciada pela densidade populacional de *D.* cf. *brevireme* obtida em abril (183,9 ind/L), ou seja, 86,1% da frequência relativa das espécies no ambiente. Um fator que pode ter contribuído para que as amostragens tivessem maior contribuição de indivíduos dessa espécie foi o local de coleta (zona litorânea), já que esta espécie é raramente encontrada na zona limnética, permanecendo mais agregada no litoral, próximo às macrófitas (Souza et al. 2017).

A taxa de consumo de recursos depende da sua disponibilidade, bem como das habilidades dos próprios organismos e as características das presas (Zaret 1980; Peckarsky 1982; Hanazato e Yasuno 1989; Woodward et al. 2005; Eitam e Blaustein 2010). Os predadores precisam de tempo para localizar, perseguir, manusear e ingerir suas presas. Um aumento na densidade de presas pode reduzir o tempo necessário para localizá-las (Eitam e Blaustein 2010). Os resultados mostram que em abril a densidade populacional média de

presas foi maior. Sendo assim, esses resultados corroboram com a hipótese de que a predação é mais intensa no período com maior densidade de presas disponíveis, já que para *M. uruguayensis* a frequência de PCRs positivas foi maior nesse período. Devido ao fato de um predador consumir o que está disponível e acessível a ele (quantitativa e qualitativamente), a predação foi mais acentuada no período com maior abundância de presas. Talvez para *R. crassifemur* não tenha havido diferença por ser um inseto semi-aquático, visto que este predador depende que as espécies zooplanctônicas alcancem o estrato superficial da água, como explicado anteriormente.

Em conclusão, o método que utiliza primers específicos para detecção de biomarcadores das espécies zooplanctônicas no tubo digestório dos predadores heterópteros do ambiente foi bem sucedido. *R. crassifemur* e *M. uruguayensis* alimentam-se de espécies zooplanctônicas no ambiente natural, embora não seja possível garantir se esses vestígios de DNA sejam provenientes de predação ativa, ou se por alimentação de restos de indivíduos mortos. Notonectídeos jovens alimentam-se de mais espécies zooplanctônicas que indivíduos adultos, já que possivelmente presas zooplanctônicas sejam de maior dificuldade de manipulação para os indivíduos adultos. No entanto, para gerrídeo, principalmente devido a seu modo de vida semi-aquático, suspeita-se que parte de sua alimentação seja proveniente de indivíduos mortos ou presos à superfície da água, já que existe a dificuldade de encontro do predador com a presa planctônica. Nesse caso não há uma seletividade acentuada, já que não há resistência das presas, o que explicaria não ter havido diferença na frequência de biomarcadores entre indivíduos jovens e adultos. Tanto para gerrídeos quanto para notonectídeos há uma seletividade acentuada por espécies de presas de maior tamanho, mesmo que em menor frequência relativa no ambiente quando comparadas a outras espécies. Acredita-se que a preferência por presas maiores esteja relacionada à maior facilidade para detecção e manipulação por parte do predador. A frequência de biomarcadores nos tubos digestórios de *M. uruguayensis* foi maior no período com maior disponibilidade de presas, pois quanto maior a densidade de presas no ambiente menor o tempo necessário para localizá-las e persegui-las, o que faz com que a taxa de predação seja maior.

REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, N., M.C. DE VICENTE and R. GABARRA, 1999. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology.* Vol. 8(9), 1467–1474.

AGUSTÍ, N., S.P. SHAYLER, J.D. HARWOOD, I.P VAUGHAN, K.D. et al., 2003a. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular ecology*. Vol. 12, 3467–3475.

AGUSTÍ, N., T.R. UNRUH and S.C. WELTER, 2003b. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bulletin of Entomological Research*. Vol. 93(3), 179–185.

ANDERSEN, N.M., 1982. The semiaquatic bugs (Hemiptera: Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. *Entomonograph*. Vol. 3, 1–455.

ARCIFA, M.S., E.A.T. GOMES and A.J. MESCHIATTI, 1992. Composition and fluctuations of the zooplankton of a tropical Brazilian reservoir. *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 123(4), 479–495.

ARCIFA, M.S., T.C.S. FERREIRA, C. FILETO, M.S.M. CASTILHO-NOLL, et. al., 2015. A long-term study on crustacean plankton of a shallow tropical lake: the role of invertebrate predation. *Journal of Limnology*. Vol. 74(3), 606–617.

ARNÉR M., S. KOIVISTO, J. NORBERG and N. KAUTSKY, 1998. Trophic interactions in rockpool food webs: regulation of zooplankton and phytoplankton by *Notonecta* and *Daphnia*. *Freshwater Biology.* Vol. 39, 79–90.

ASAHIDA, T., Y. YAMASHITA and T. KOBAYASHI, 1997. Identification of consumed stone flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilewsky), from the stomach contents of sand shrimp, *Crangon affinis* (De Haan) using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* Vol. 217(2), 153–163.

BLANKENSHIP, L.E. and A.A YAYANOS, 2005. Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets. *Molecular Ecology.* 14(3), 891–899.

BLAUSTEIN, L., 1998. Influence of the predatory backswimmer *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecological Entomology.* Vol. 23, 246–252.

BLAUSTEIN, L., B.P. KOTLER and D. WARD, 1995. Direct and indirect effects of a predatory backswimmer (*Notonecta maculata*) on community structure of desert temporary pools. *Ecological Entomology.* Vol. 20(4), 311–318.

BROOKS, J.L., 1968. The effects of prey size selection by lake planktivores. *Systematic Biology.* Vol. 17(3), 273–291.

BROOKS, J.L. and S.I. DODSON, 1965. Predation, body size, and composition of plankton.

Science. Vol. 50(3692), 28–35.

CANTANHÊDE, G., R. FUGI and N.S. HAHN, 2009. Variation in prey selection of a piscivorous fish after the impoundment of a neotropical reservoir: Prey size and type. *Journal of Fish Biology*. Vol. 75(1), 75–86.

CASTILHO-NOLL, M.S.M. and M.S. ARCIFA, 2007. *Chaoborus* diet in a tropical lake and predation of microcrustaceans in laboratory experiments. *Acta Limnologica Brasiliensia.* Vol. 19(1), 163–174.

CHESSON, J., 1978. Measuring preference in selective predation. *Ecology.* Vol. *59*(2), 211–215.

CLETO-FILHO S.E.N. and M.S. ARCIFA, 2006. Horizontal distribution and temporal variation of the zoobenthos of a tropical Brazilian lake. *Acta Limnologica Brasiliensia*. Vol. 18(4), 407–421.

COHEN, J.E., S.L. PIMM, P. YODZIS and J. SALDANA, 1993. Body sizes of animal predators and animal prey in food webs. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 62(1), 67–78.

COOPER, S.D., 1983. Selective predation on cladocerans by common pond insects. *Canadian Journal of Zoology.* Vol. 61(4), 879–886.

CUMMINS, K.W, 1973. Trophic relations of aquatic insects. *Annual Review of Entomology.* Vol. 18, 183–206.

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017a. Distribution and fluctuations of backswimmers (Notonectidae) in a tropical shallow lake and predation on microcrustaceans. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. 77(1), 108–117

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017b. Spatial and temporal distribution of gerrid (Heteroptera) and predation on microcrustaceans from a tropical shallow lake. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. 77(2), 289–298.

DUBOVSKAYA, O.P., V.P. SEMENCHENKO, M.I. GLADYSHEV, J.F. BUSEVA, et al., 2007. Non-predatory mortality indices of cladoceran zooplankton in the pelagial and littoral of a shallow meso-eutrophic lake. *Doklady Biological Sciences*. Vol. 416(1), 391–393.

EITAM, A. and L. BLAUSTEIN, 2010. Effects of predator density and duration of predator occupancy on crustacean abundance and diversity in experimental pools. *Hydrobiologia*, Vol. 652, 269–276.

ELLIS, R.A. and J. H. BORDEN, 1970. Predation by *Notonecta undulata* (Heteroptera: Notonectidae) on larvae of the yellow-fever mosquito. *Annals of the Entomological Society of America*. Vol. 63(4), 963–973.

FERNANDO, C.H., C. TUDORANCEA and S. MENGESTOU, 1990. Invertebrate zooplankton predator composition and diversity in tropical lentic waters. *Hydrobiologia*. Vol. 198(1), 13–31.

FERREIRA, T.C.S., M.S. ARCIFA and A.R. DOMINGOS, 2018. Is competition an interaction as relevant as predation for tropical planktonic cladocerans*? Acta Limnologica Brasiliensia.* Vol. 30, e1.

FISCHER S., D. PEREYRA and L. FERNÁNDEZ, 2012. Predation ability and non-consumptive effects of *Notonecta sellata* (Heteroptera: Notonectidae) on immature stages of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology.* Vol. 37(1), 245–251.

FOLTAN, P., S. SHEPPARD, M. KONVICKA and W.O.C. SYMONDSON, 2005. The significance of facultative scavenging in generalist predator nutrition: detecting decayed prey in the guts of predators using PCR. *Molecular Ecology*. Vol. 14(13), 4147–4158.

GERGS, A. and H.T. RATTE, 2009. Predicting functional response and size selectivity of juvenile *Notonecta maculata* foraging on *Daphnia magna*. *Ecological Modelling*. Vol. 220, 3331-3341.

GILBERT, J.J. and C.W. BURNS, 1999. Some observations on the diet of the backswimmer, *Anisops wakefieldi* (Hemiptera: Notonectidae). *Hydrobiologia*. Vol. 412, 111–118.

GREENSTONE, M.H. and K.A. SHUFRAN, 2003. Spider predation: species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. *Journal of Arachnology.* Vol. 31(1), 131–134.

HAJIBABAEI, M., M.A. SMITH, D.H. JANZEN, J.J. RODRIGUEZ, et al., 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes.* Vol. 6(4), 959–964.

HAJIBABAEI, M., S. SHOKRALLA, X. ZHOU, G.A.C. SINGER, et al., 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One*. Vol. 6(4), e17497.

HALL, D.J., S.T. THRELKELD, C.W. BURNS and P.H. CROWLEY, 1976. The size-efficiency hypothesis and the size structure of zooplankton communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 7, 177–208.

HALL, D.J., W.E. COOPER and E.E. WERNER, 1970. An experimental approach to the production dynamics and structure of freshwater animal communities. *Limnology and Oceanography*. Vol. 15(6), 839–928.

HAMPTON, S.E. and J.J. GILBERT, 2001. Observations of insect predation on rotifers. *Hydrobiologia.* Vol. 446/447, 115–121.

HAMPTON, S.E., J.J. GILBERT and C.W. BURNS, 2000. Direct and indirect effects of juvenile *Buenoa macrotibialis* (Hemiptera: Notonectidae) on the zooplankton of a shallow pond. *Limnology and Oceanography*. Vol. 45(4), 1006–1012.

HANAZATO, T. and M. YASUNO, 1989. Zooplankton community structure driven by vertebrate and invertebrate predators. *Oecologia*. Vol. 81, 450–458.

HANEY, J.F. and D.J. HALL, 1973. Sugar-coated *Daphnia*: a preservation technique for Cladocera. *Limnology and Oceanography*. Vol. 18(2), 331–333.

HOOGENDOORN, M. and G.E. HEIMPEL, 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology.* Vol. 10(8), 2059–2067.

JARMAN, S.N., N.J. GALES, M. TIERNEY, P.C. GILL, et al., 2002. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Molecular Ecology.* Vol. 11(12), 2679–2690.

JUEN, A. and M. TRAUGOTT, 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*. Vol. 142(3), 344–352.

KERFOOT, W.C. and A.E.D.S. SIH. *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. Hanover: University Press of New England. 1987.

KING, R.A., D.S. READ, M. TRAUGOTT and W.O.C. SYMONDSON, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*. Vol. 17, 947–963.

KING, R.A., I.P. VAUGHAN, J.R. BELL and D.A. BOHAN, 2010. Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species- and lineage-specific PCR primers. *Molecular Ecology.* Vol. 19, 1721–1732.

KUUSK, A.K. and N. AGUSTÍ, 2008. Group-specific primers for DNA-based detection of springtails (Hexapoda: Collembola) within predator gut contents. *Molecular Ecology Resources*. Vol. *8*(3), 678–681.

LAMPERT, W. and U. SOMMERS. *Limnoecology*, (2nd edn), Oxford, University Press: 2007.

MCLEAN, E.B., 1990. Sexual dimorphism and predaceous feeding habits of the waterstrider *Gerris remigis* Say (Heteroptera: Gerridae). *Canadian Journal of Zoology*. Vol. 68(12), 2688–2691.

METZKER, M.L., 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 11(1), 31– 46.

MOREBY, S.J., 1988. An aid to the identification of arthropod fragments in the faeces of gamebird chicks (galliformes). *Ibis.* Vol. 130(6), 519–526.

MURDOCH, W.W. and M.A. SCOTT, 1984. Stability and extinction of laboratory populations of zooplankton preyed on by the backswimmer *Notonecta*. *Ecology*. Vol. 64(4), 1231–1248.

MURDOCH, W.W., M.A. SCOTT and P. EBSWORTH, 1984. Effects of the general predator, *Notonecta* (Hemiptera) upon a freshwater community. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 53(3), 791–808.

NESBIT, L.M., H.P. RIESSEN and C.W. RAMCHARAN, 1996. Opposing predation pressures and induced vertical migration responses in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography.* Vol. 41(6), 1306–1311.

PALUMBI, S.R.. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D. M., C. MORITZ and B.K. MABLE, (eds). *Molecular systematics*, (2nd ed). Sunderland, Sinauer, , US-MA: 1996.

PALUMBI, S.R., A. MARTIN, S. ROMANO W.O. MCMILLAN, et al.. *The simple fool's guide to PCR, Version 2.0*. University of Hawaii, US-HI: 1991.

PECKARSKY, B.L., 1982. Aquatic insect predator-prey relations. *Bioscience.* Vol. 32(4), 261–266.

PIÑOL, J., V. SAN ANDRÉS, E.L. CLARE, G. MIR, et al., 2014 A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 14(1), 18–26.

POMPANON, F., B.E. DEAGLE, W.O.C. SYMONDSON, D.S. BROWN, et al., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*. Vol. 21(8), 1931–1950.

QUIROZ-MARTÍNEZ, H. and A. RODRÍGUEZ-CASTRO, 2007. Aquatic insects as predators of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Vol. 23(sp2), 110–117.

RHODE, S.C., M. PAWLOWSKI and R.TOLLRIAN, 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature*. Vol. 412(6842), 69–72.

SCOTT, M.A. and W.W. MURDOCH, 1983. Selective predation by the backswimmer, *Notonecta*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 28(2), 352–366.

SHOKRALLA, S., J.L. SPALL and J.F. GIBSON, 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology.* Vol. 21, 1794–1805.

SOUZA, B.B., M.S. ARCIFA, T.C.S. FERREIRA, L.H.S. DA SILVA et. al., 2017. Are the littoral zone conditions suitable for tropical planktonic microcrustaceans? *Annales de Limnologie*. Vol. 53, 281–291.

SPENCE, J.R. and N.M. ANDERSEN, 1994. Biology of water striders: interactions between systematics and ecology. *Annual Review of Entomology*. Vol. 39, 101–128.

SYMONDSON, W.O.C., 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*. Vol. 11, 627–641.

TÖBE, K., B. MEYER and V. FUENTES, 2010. Detection of zooplankton items in the stomach and gut content of larval krill, *Euphausia superba*, using a molecular approach. *Polar Biology.* Vol. 33(3), 407–414.

VANDERPLOEG, H.A. and D. SCAVIA, 1979. Two electivity indices for feeding with special reference to zooplankton grazing. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. Vol. 36(4), 362–365.

VESTHEIM, H. and S.N. JARMAN, 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology.* Vol. 5(1), 1–11.

VESTHEIM, H., B. EDVARDSEN and S. KAARTVEDT, 2005. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific PCR. *Marine Biology.* Vol. 147(2), 381–385.

WARE, D.M., 1972. Predation by rainbow trout (*Salmo guirdneri*): The influence of hunger, prey density, and prey size. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. Vol. 29, 1193–1201.

WARREN, P.H. and J.H. LAWTON, 1987. Invertebrate predator-prey body size relationships: an explanation for upper triangular food webs and patterns in food web structure? *Oecologia*. Vol. 74, 231–235.

WILLIAMSON, C.E., J.M. FISCHER, S.M. BOLLENS, E.P. OVERHOLT, et al., 2011. Toward a more comprehensive theory of zooplankton diel vertical migration: Integrating ultraviolet radiation and water transparency into the biotic paradigm. *Limnology and Oceanography*. Vol. 56(5), 1603–1623.

WOODWARD, G. and A.G. HILDREW, 2002. Body-size determinants of niche overlap and intraguild predation within a complex food web. *Journal of Animal Ecology.* 71(6), 1063–1074.

WOODWARD, G., B. EBENMAN, M. EMMERSON, J.M. MONTOYA, et al., 2005. Body size in ecological networks. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 20(7), 402– 409.

ZAIDI, R.H., Z. JAAL, N.J. HAWKES, J. HEMINGWAY, et al., 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology.* Vol. 8(12), 2081–2087.

ZARET, T.M.. *Predation and Freshwater Communities*. New Haven: Yale University Press. 1980.

4 CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PREDAÇÃO *IN SITU* DE *Martarega uruguayensis* SOBRE MICROCRUSTÁCEOS COM EXPERIMENTO EM MESOCOSMO

RESUMO

Experimento em mesocosmo foi utilizado para avaliar o efeito da predação do notonectídeo *Martarega uruguayensis* sobre a densidade das populações de presas zooplanctônicas em um lago tropical raso, de modo a testar a hipótese de que esses predadores são capazes de alterar a estrutura da comunidade de presas. As estruturas foram fixadas próximo à borda das macrófitas aquáticas *Ludwigia* sp., com aproximadamente 1 m de profundidade. Os tratamentos utilizados, com três réplicas cada foram: (1) Tratamento PJ, contendo as presas zooplanctônicas da coluna d'água + os predadores jovens; (2) Tratamento PA contendo as presas zooplanctônicas da coluna d'água + os predadores adultos; (3) Tratamento C (controle) contendo somente as presas zooplanctônicas e nenhum predador. O monitoramento das presas foi efetuado diariamente durante 6 dias, com um total de 10 L de água bombeado de cada mesocosmo. Foram identificadas 5 espécies de microcrustáceos nas amostras coletadas: os cladóceros *Ceriodaphnia richardi, Daphnia gessneri, Diaphanosoma* cf. *brevireme* e os copépodos *Thermocyclops decipiens* e *Mesocyclops* sp. O grupo mais frequente foram os copépodos, sendo náuplios os mais abundantes (60,7%), seguidos pelos copepoditos (23,3%) e pelos adultos (7,4%). Os cladóceros mais frequentes foram *C. richardi* (4,4%)*, D. gessneri* (2,9%) e *D.* cf. *brevireme* (1,3%). Todas as espécies zooplanctônicas apresentaram efeitos dos tratamentos em sua abundância, exceto *D.* cf. *brevireme*. No geral, não houve influência significativa dos predadores sobre nenhuma espécie nos dois primeiros dias. Os efeitos da predação sobre copepoditos e náuplios foram mais acentuados entre os dias 3 e 4, enquanto que para copépodos adultos foram nos dias 2 e 3. Já para os cladóceros o efeito foi mais acentuado nos dias 4 a 6, exceto para *D.* cf. *brevireme* que não teve efeito da predação em nenhum dia. Ainda que o mesocosmo não seja capaz de recriar totalmente as condições da zona litorânea, os resultados mostraram que de fato notonectídeos associados à região litorânea podem efetivamente reduzir a densidade de algumas espécies zooplanctônicas. Aspectos relacionados ao tamanho corporal, densidade populacional, capacidade de evasão e diminuição da sobreposição entre predador e presa são fundamentais no padrão de seletividade e a preferência alimentar do notonectídeo *M. uruguayensis.*

Palavras Chave: Predação; lago tropical raso, mesocosmo, microcrustáceos, notonectídeos.

4 CHAPTER III - EVALUATION OF THE IMPACT OF IN-SITU PREDATION OF *Martarega uruguayensis* ON MICROCRUSTACEANS IN MESOCOSM EXPERIMENT

ABSTRACT

In order to test the hypothesis that notonectids *Martarega uruguayensis* are capable of altering the structure of the zooplanktonic prey community in a tropical shallow lake, a mesocosm experiment was used to evaluate the predation effect on the density of prey populations. The structures were fixed near the edge of the aquatic macrophytes *Ludwigia* sp., approximately 1 m deep. The treatments used, with three replicates each were: (1) PJ treatment, containing the zooplankton prey of the water column + the young predators; (2) PA treatment containing zooplankton prey from the water column + adult predators; (3) Treatment C (control) containing only zooplankton prey and no predator. The monitoring of prey was performed daily for 6 days, with a total of 10 L of water pumped and filtered from each mesocosm. Five species of microcrustaceans were identified in the samples: the cladocerans *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia gessneri, Diaphanosoma* cf. *brevireme* and the copepods *Thermocyclops decipiens* and *Mesocyclops* sp. The most frequent group were copepods, with nauplii being the most abundant (60.7%), followed by copepodites (23.3%) and adults (7.4%). The most frequent cladocerans were *C. richardi* (4.4%), *D. gessneri* (2.9%) and *D*. cf. *brevireme* (1.3%). All zooplankton species showed effects of the treatments in their abundance, except *D*. cf. *brevireme.* In general, there was no significant influence of predators in the first two days for any species. The effects of predation on copepodites and nauplii were more pronounced between days 3 and 4, whereas for adult copepods were on days 2 and 3. For cladocerans the effect was more pronounced on days 4 to 6, except for *D*. cf. *brevireme* with no effect of predation in any day. Although the mesocosms are not able to completely recreate the littoral zone conditions, the results showed that in fact notonectids associated with the vegetation in the littoral zone can effectively reduce the density of some zooplankton species. Aspects related to body size, population density, evasion capacity and lower overlap between predator and prey are fundamental for the selectivity pattern and feeding preference of the notonectid *M. uruguayensis*.

Keywords: Predation; tropical shallow lake, mesocosmo, microcrustaceans, notonectids.

4.1 Introdução

A predação em ecossistemas aquáticos lênticos tem sido considerada o principal fator no controle das densidades e na estrutura das comunidades zooplanctônicas quando comparado com outros fatores, como escassez de alimento, parasitismo e fatores abióticos limitantes (Zaret 1980, Gliwicz e Pijanowska 1989). A seletividade das presas e o efeito da predação depende de fatores como: o efeito conjunto das espécies de presas e predadores presentes no meio ambiente (Hanazato e Yasuno 1989), o tamanho das presas (Brooks e Dodson 1965; Brooks 1968; Hall et al. 1976), a densidade e a duração da pressão predatória induzida por migrações (Perticarrari et al. 2004; Gonzáles Sagrario et al. 2009; Eitam e Blaustein 2010; Minto et al. 2010), comportamentos de forrageamento dos predadores e mecanismos de defesa e evasão das presas (Peckarsky 1982; Cooper et al. 1985). Na ausência de predadores vertebrados, invertebrados é que podem exercer um forte impacto sobre as populações zooplanctônicas (Zaret 1980; Lair 1990).

As larvas de *Chaoborus* estão entre os mais comuns predadores invertebrados em ecossistemas lênticos tropicais (Arcifa 1997; Arcifa 2000; Castilho-Noll e Arcifa 2007). Contudo, outros predadores invertebrados também são conhecidos por serem agentes estruturadores de comunidades zooplanctônicas em lagos tropicais, como por exemplo os insetos aquáticos conhecidos como “backswimmers” (Heteroptera: Notonectidae). Alguns estudos têm relatado a migração horizontal do zooplâncton para a borda de bancos de macrófitas durante o dia para buscar refúgio de predadores limnéticos (Lauridsen e Buenk 1996; Stansfield et al. 1997; Gonzáles Sagrario et al. 2009). Entretanto, além de servir de refúgio para microcrustáceos, as macrófitas também fornecem hábitat para macro invertebrados predadores, incluindo os notonectídeos, muito abundantes nessa região (Bennett e Streams 1986; Bailey 1987; Hirvonen 1999; Domingos e Arcifa 2017a; Plaska e Mieczan 2018), podendo exercer impacto predatório sobre as populações desses organismos quando permanecem na zona litorânea.

Notonectídeos são predadores invertebrados que podem desempenhar um papel importante na estruturação de comunidades de microcrustáceos em vários ambientes de água doce (Nesbitt et al. 1996; Blaustein 1998; Hampton et al. 2000). Eles são principalmente associados às áreas litorâneas com bancos de macrófitas, embora também possam habitar a zona limnética em menor densidade (Domingos e Arcifa 2017a), já que seu padrão de distribuição depende de fatores bióticos e abióticos (Bennett e Streams 1986; Bailey 1987; Streams 1987a; Gilbert et al. 1999; Foltz e Dodson 2009). Diversos estudos reportaram que

sua dieta inclui vários organismos aquáticos, como rotíferos, microcrustáceos, larvas de mosquitos, girinos e outros insetos aquáticos (Hirvonen 1992; Blaustein 1998; Gilbert e Burns 1999; Hampton e Gilbert 2001; Saha et al. 2010; Jara et al. 2012; Fischer et al. 2012, 2013). Alguns autores demonstraram em experimentos de predação que há uma diminuição do apetite nos indivíduos adultos (Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Domingos e Arcifa 2017a), enquanto que Gilbert e Burns (1999) demonstraram o oposto. Há também autores que observaram a seleção de presas por insetos aquáticos em função do tamanho, com preferência por espécies maiores (Cooper 1983; Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Gilbert e Burns 1999; Gergs e Ratt 2009; Domingos e Arcifa 2017a). Estes aspectos referentes à predação de notonectídeos sobre espécies zooplanctônicas foram observadas em laboratório (Sih 1982; Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Streams 1987b; Gilbert e Burns 1999; Hampton e Gilbert 2001; Gergs e Ratte 2009; Saha et al. 2010; Fischer et al. 2012, 2013; Plaska e Mieczan, 2018), em recipientes a céu aberto (Arnér et al. 1998; Eitam e Blaustein 2010), em poças naturais (Nesbitt et al. 1996), “enclosures” (Blaustein 1998) e em pequenos lagos (Hampton et al. 2000). Contudo, um fator importante é que grande parte desses estudos que avaliaram a predação de heterópteros foram realizados em laboratório, e muito poucos realizados em ambientes naturais. Dessa maneira, é importante enfatizar que experimentos em laboratório não são capazes de simular totalmente a estrutura real do ecossistema, já que dificilmente é possível controlar todas as variáveis quando se trabalha com diferentes tratamentos, mesmo quando realizados diretamente no hábitat natural das espécies em questão. Sendo assim, mesmo com o arcabouço desses trabalhos, uma questão que surge é se no ambiente natural os heterópteros são capazes de alterar a estrutura da comunidade de presas zooplanctônicas. Dessa forma, para se contornar este problema é necessário que seja feita uma análise diretamente no hábitat, com a menor interferência possível do desenho experimental. Neste contexto, experimento em mesocosmo é uma opção viável para este propósito, visto que mesocosmo é um sistema experimental externo que reproduz o ambiente natural sob condições controladas. Em contraste com experimentos de laboratório, os estudos com mesocosmos normalmente são realizados no próprio ambiente, de modo a incorporar-se a variação natural. Essas estruturas são úteis para testar hipóteses em ecossistemas aquáticos lênticos, embora apresentem alguns problemas, como sedimentação de algas, alteração da circulação de água, dificuldade para associar macrófitas enraizadas, entre outros. No entanto, a menos que se use um lago inteiro ou um pequeno lago como unidades experimentais, para testar hipóteses nesses ambientes, é necessário envolver parte dele em unidades menores (mesocosmo).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da predação do notonectídeo *Martarega uruguayensis* sobre a densidade das populações de presas zooplanctônicas em um experimento em mesocosmo, de modo a testar a hipótese de que esses predadores são capazes de alterar a estrutura da comunidade de presas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Área de estudo

O Lago Monte Alegre (21º 10' 04" S; 47º 51' 28" W) está localizado dentro do Campus da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto-SP - Sudeste do Brasil. O reservatório foi criado em 1942 a partir do represamento do córrego Laureano, um dos afluentes do Rio Pardo. Nesse período, o lago servia principalmente para irrigação e recreação. Contudo, desde a década de 1980 passou a ser utilizado como local de pesquisa e ensino, além do valor ornamental. Embora o lago criado seja artificial (i.e. classificado como reservatório), a inexistência de manipulação das comportas e o tempo de residência relativamente alto para suas dimensões (~ 45 dias) fazem com que seu funcionamento seja semelhante ao de um ambiente lacustre natural, com uma comunidade biológica já estabelecida. O reservatório é raso e pequeno (área = 7 ha, profundidade máxima = 5 m, profundidade média = 2,9 m, variação máxima anual do nível = 0,4 m, vazão máxima do córrego formador = 0,0095 m^3/s e altitude 500 m) (Arcifa 1990) e com base em Lewis (1983) pode ser classificado como polimíctico descontínuo quente. O Clima da região é caracterizado como Tropical de transição entre quente e sub quente, com duas estações bem marcadas: quente-chuvosa (outubro a abril) e fria-seca (maio a setembro). O único peixe planctófago é o adulto do ciclídeo *Coptodon rendalli* (Boulenger), que não é abundante (Arcifa e Meschiatti 1993). Os predadores invertebrados mais comuns são: o díptero *Chaoborus brasiliensis* (Arcifa 1997), o ácaro *Krendowskia* sp. (Cassano 2002), o notonectídeo *Martarega uruguayensis* (Domingos e Arcifa 2017a)e o gerrídeo *Rheumatobates crassifemur* (Domingos e Arcifa 2017b).

4.2.2 Coleta dos predadores

As coletas dos insetos foram realizadas na zona litorânea (aproximadamente 1 m de profundidade), próximo à borda das macrófitas enraizadas, *Ludwigia* sp., 1 dia antes de

montar os experimentos, e em todos os dias seguintes às amostragens do zooplâncton para repor os indivíduos mortos durante o período de estudo. Para coletar os insetos foi utilizada uma rede em "D" (malha 0,5 mm) e um barco pequeno com motor elétrico. Todos os espécimes coletados foram imediatamente armazenados em recipientes de vidro e levados ao laboratório, onde foram divididos em grupos de indivíduos adultos e jovens.

4.2.3 Desenho e montagem dos experimentos in situ

O experimento foi realizado no final do período frio-seco, em agosto de 2016., durante o período de 6 dias. Foram utilizadas 9 estruturas de mesocosmo com cilindro feito de plástico atóxico e diâmetro do aro da boca de 1,3 m, sendo o fundo fechado para isolar as estruturas do ambiente externo (Arcifa e Guagnoni 2003). As estruturas foram fixadas próximo à borda das macrófitas aquáticas *Ludwigia* sp., com aproximadamente 1 m de profundidade no local selecionado para ancoragem (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Unidades do mesocosmo ancoradas na zona litorânea com aproximadamente 1m de profundidade.

Para encher as estruturas do mesocosmo construído, as bocas (onde encontram-se os aros) foram viradas para baixo em direção ao fundo do lago até englobar uma porção da coluna d'água, de forma cautelosa para não tocar no sedimento do fundo, conforme o método descrito por Arcifa e Guagnoni (2003). Para evitar a entrada de outros predadores presentes na coluna (e.g., *Chaoborus brasiliensis* e *Krendowskia* sp.) no momento do enchimento, foi

utilizada uma tela (filó) na boca do mesocosmo, com malha de aproximadamente 1mm para evitar a entrada dos predadores, mas permitir a passagem de espécies zooplanctônicas. Os predadores coletados no dia anterior foram adicionados às unidades do mesocosmo conforme a configuração dos tratamentos, com três réplicas cada: (1) Tratamento **PJ,** contendo as presas zooplanctônicas da coluna d'água + os predadores jovens; (2) Tratamento **PA** contendo as presas zooplanctônicas da coluna d'água + os predadores adultos; (3) Tratamento **C** (controle) contendo somente as presas zooplanctônicas e nenhum predador. Nos tratamentos **PJ** e **PA**, foram introduzidos predadores em densidade populacional semelhante ao ambiente natural (163 ind./m²), conforme densidades reportadas no lago por Domingos e Arcifa (2017a). O filó cobriu cada réplica para evitar a fuga dos notonectídeos e a entrada de outros, durante todo o período de experimento. As estruturas montadas foram monitoradas diariamente por 6 dias. Para o monitoramento e amostragem das presas, um total de 10 L de água foi bombeado de cada unidade do mesocosmo, utilizando-se uma bomba (Jabsco ITT Ind., Costa Mesa, EUA), com capacidade de 30 L/min. Uma mangueira acoplada à bomba foi utilizada para fazer a amostragem dentro das unidades. A água foi filtrada através de uma rede com malha de 60 µm e devolvida ao mesocosmo para não alterar seu volume. Os organismos capturados na rede foram fixados de acordo com Haney e Hall (1973). Com o intuito de manter constante a densidade dos predadores, eles foram capturados com uma rede em D de forma exaustiva em cada amostragem do zooplâncton, contados e devolvidos às estruturas. Esse procedimento foi adotado após o dia em que os predadores foram inseridos nas estruturas. A partir dessa contagem aproximada de predadores vivos foi estimada a taxa de mortalidade dos mesmos. Esses indivíduos mortos foram substituídos por indivíduos coletados no dia anterior afim de manter a densidade de predadores aproximadamente constante durante todo o período do experimento. Posteriormente, para contagem integral das amostras zooplanctônicas foi utilizado um microscópio estereoscópico e placa de Petri quadriculada, sendo que a variável adotada para a quantificação das amostras foi a densidade, dada como ind./10 L. Com os valores de densidade obtidos nas contagens, foi efetuada uma análise de variância (ANOVA) com 2 fatores para se avaliar o efeito dos tratamentos (PJ, PA e C), e do tempo (dias de coleta 0-6) sobre a densidade das espécies zooplanctônicas. *Post hoc* Tukey (HSD) foi utilizado para comparar as respostas de cada tratamento.

4.3 Resultados

Foram identificadas 5 espécies de microcrustáceos nas amostras coletadas durante os 6 dias de experimento: os cladóceros *Ceriodaphnia richardi, Daphnia gessneri, Diaphanosoma* cf. *brevireme* e os copépodos *Thermocyclops decipiens* e *Mesocyclops* sp. Contudo, as duas espécies de copépodos foram agrupadas, visto que a abundância de *T. decipiens* foi muito baixa a ponto de comprometer a análise estatística. As duas espécies foram agrupadas e divididas quanto ao estágio de desenvolvimento: copépodos adultos, copepoditos e náuplios. Nenhuma larva de Chaoboridae ou outro predador aquático foram encontrados nas amostras. O grupo mais frequente nas contagens foram os copépodos, sendo náuplios os mais abundantes (60,7%), seguidos pelos copepoditos (23,3%) e pelos adultos (7,4%). Em seguida, as espécies mais frequentes foram *C. richardi* (4,4%), *D. gessneri* (2,9%) e *D.* cf. *brevireme* (1,3%), a menos frequente nas amostras (Tabela 4.1).

Tabela - 4.1 Valores mínimos, máximos e médios de densidades (ind./10 L) dos grupos zooplanctônicos e seu tamanho médio, e a frequência relativa de cada espécie (%) em amostras coletadas no mesocosmo.

Espécies	**Tamanho (mm)**	**Dens. Mín.**	**Dens. Máx.**	**Dens. Méd.**	**Freq. Rel.**
C. richardi	0,81	4	38	13,2	4,4
D. gessneri	1,12	1	27	8,7	2,9
D. cf. *brevireme*	0,53	0	15	3,8	1,3
Copépodos adultos	0,67	7	48	22,2	7,4
Copepoditos	0, 51	28	121	69,8	23,3
Náuplios	0,36	95	264	182,1	60,7

Todas as espécies zooplanctônicas apresentaram efeitos dos tratamentos em sua abundância, exceto *D.* cf. *brevireme* (Tabela 4.2). Além disso, todas as espécies apresentaram efeito do tempo na abundância (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Análise de variância (Anova, p < 0,05) para o efeito dos tratamentos (PJ, PA e C), e do tempo (dias de coleta 0 a 6) sobre as densidades (ind./10 L) das presas zooplanctônicas.

Efeitos	**df**	**MS**	**F**	**p**
Náuplio				
Tempo	6	71,7	11,5	***0,00***
Tratamento	2	101,1	16,2	***0,00***
Copepodito				
Tempo	6	5,2	1,9	***0,10***
Tratamento	2	23,9	8,7	***0,00***
Copépodos adultos				
Tempo	6	2,3	4,1	***0,01***
Tratamento	2	3,7	6,6	***0,01***
Diaphanosoma* cf. *brevireme				
Tempo	6	0,4	6,9	***0,00***
Tratamento	2	0,0	0,4	0,70
Ceriodaphnia richardi				
Tempo	6	3,4	19,1	***0,00***
Tratamento	2	3,1	17,1	***0,00***
Daphnia gessneri				
Tempo	6	1,0	7,0	***0,00***
Tratamento	2	2,9	20,2	***0,00***

A comparação das médias do período entre os tratamentos mostrou que o tratamento PJ foi diferente do controle para todas as espécies (p < 0,05), exceto *D.* cf. *brevireme*. Já no tratamento PA, a média de densidade total foi diferente do controle para náuplios e copepoditos (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Valores de p em relação à comparação das médias gerais nos 6 dias de coleta entre os tratamentos C-PJ e C-PA (Tukey, p < 0,05).

Espécies	**C-PA**	**C-PJ**
Náuplio	***0,00***	***0,00***
Copepodito	***0,02***	***0,00***
Copépodos adultos	0,24	***0,02***
D. cf. *brevireme*	0,86	0,94
C. richardi	0,09	***0,00***
D. gessneri	0,12	***0,00***

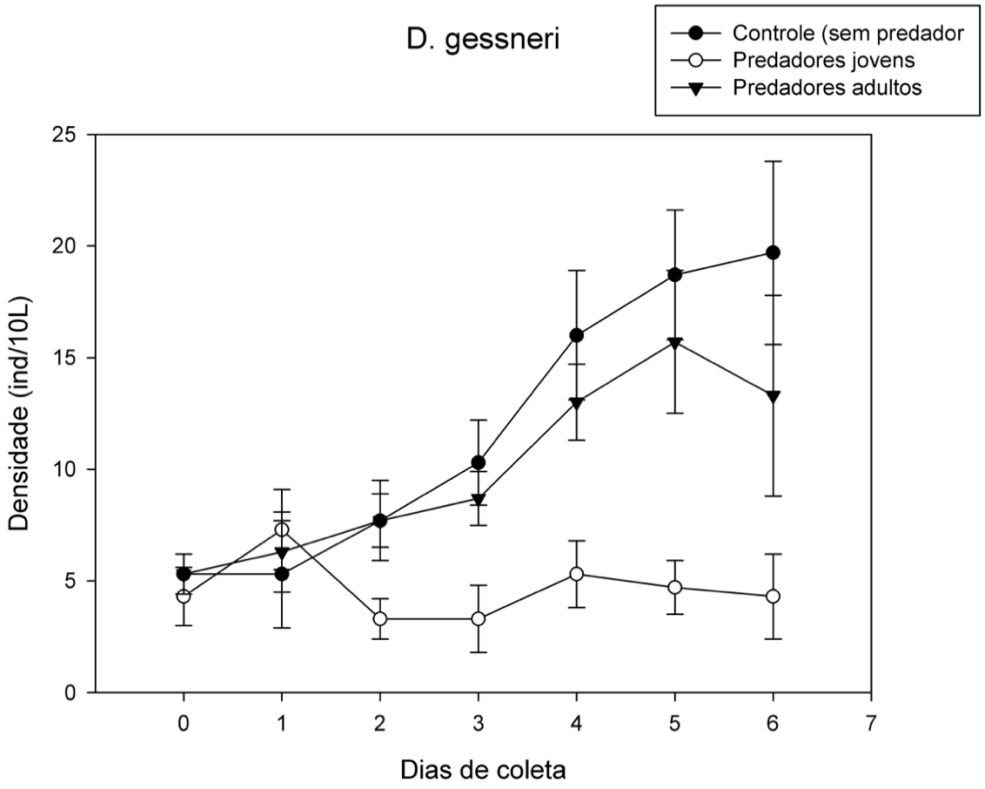
A densidade de *D. gessneri* aumentou durante os dias de coleta nos tratamentos PA e C, e não houve influência de predação nos dias 1 e 2, ou seja, a abundância nos três tratamentos foi igual no início do experimento (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Valores de p em relação à comparação das médias em cada um dos 6 dias de coleta entre os tratamentos C-PJ e C-PA (Tukey, $p < 0,05$).

Tratamento	**Dia**	**Náuplio**	**Copepodito**	**Copépodo**	***D.* cf. *brevireme***	***C. richardi***	***D. gessneri***
(C-PA)	0	0,78	0,66	0,66	0,73	0,84	1,00
(C-PJ)	0	0,73	0,96	0,82	0,77	0,70	0,74
(C-PA)	1	0,25	0,89	0,74	0,98	1,00	0,74
(C-PJ)	1	0,26	0,59	0,87	0,86	0,92	0,52
(C-PA)	2	0,18	0,52	0,41	0,60	1,00	1,00
(C-PJ)	2	*** 0,04 ***	0,49	*** 0,03 ***	0,86	0,50	0,08
(C-PA)	3	*** 0,01 ***	*** 0,03 ***	0,23	0,81	0,18	0,59
(C-PJ)	3	*** 0,01 ***	*** 0,00 ***	*** 0,00 ***	0,90	*** 0,01 ***	*** 0,03 ***
(C-PA)	4	*** 0,02 ***	*** 0,01 ***	0,26	0,97	0,21	0,34
(C-PJ)	4	*** 0,00 ***	*** 0,00 ***	0,09	0,86	*** 0,00 ***	*** 0,00 ***
(C-PA)	5	0,46	0,27	0,51	0,73	0,06	0,33
(C-PJ)	5	0,57	*** 0,03 ***	0,62	0,84	*** 0,00 ***	*** 0,00 ***
(C-PA)	6	*** 0,01 ***	0,16	0,70	0,49	0,07	*** 0,04 ***
(C-PJ)	6	*** 0,01 ***	0,08	0,11	0,86	*** 0,00 ***	*** 0,00 ***

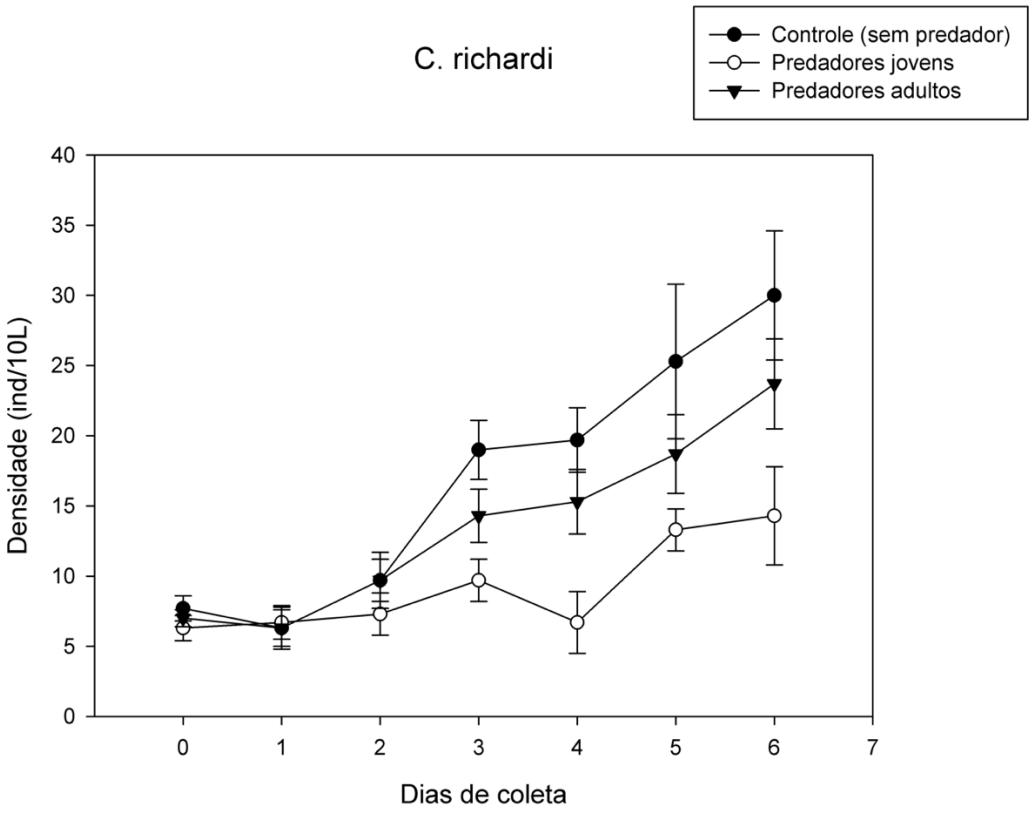
A partir do dia 3 começou a ocorrer impacto dos predadores, especialmente no tratamento PJ, o que ocasionou uma queda gradativa da densidade de *D. gessneri* nesse tratamento em relação aos tratamentos PA e C. No tratamento PA, a densidade em cada período foi estatisticamente igual ao C, exceto no dia 6, o que demonstra maior impacto da predação dos insetos jovens sobre *D. gessneri,* e praticamente nenhum efeito de predadores adultos (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Densidade (média ± EP) de *D. gessneri* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.



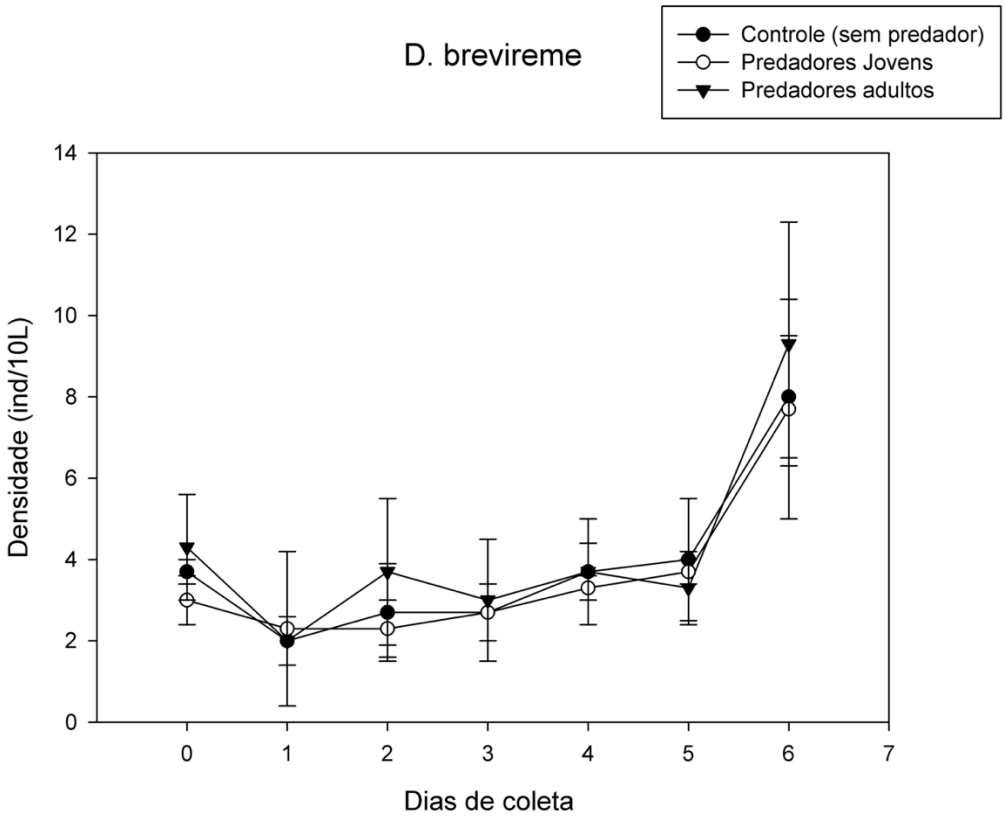
A densidade de *C. richardi* aumentou durante os dias de coleta em todos os tratamentos, exceto no dia 4 para o tratamento PJ, o qual apresentou uma ligeira queda. Não houve influência significativa de predação nos dias 1, 2, ou seja, a densidade de *C. richardi* nos três tratamentos foi estatisticamente igual durante esse período. Contudo, a partir do dia 3 começou a ocorrer impacto dos predadores no tratamento PJ até o final do período (Tabela 4.4). A influência da predação não foi significativa no tratamento PA, ou seja, não houve influência de predadores adultos (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Densidade (média ± EP) de *C. richardi* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.



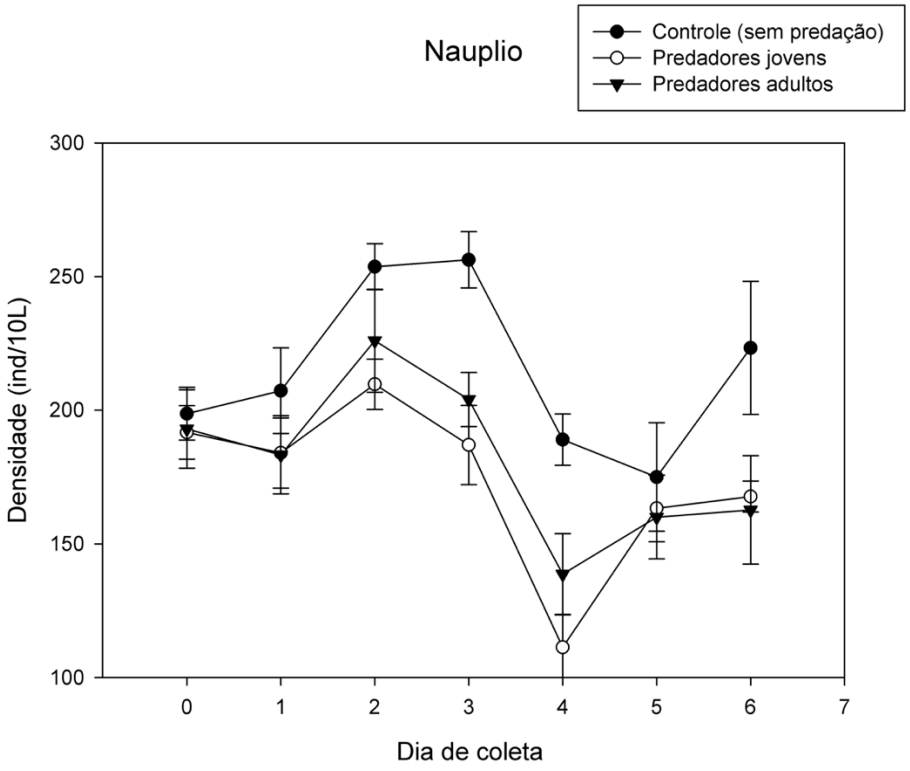
Houve uma diminuição na densidade de *D.* cf. *brevireme* no dia 1 para todos os tratamentos, mas ao longo dos dias seguintes de coleta houve um aumento. Não houve efeito de predação em nenhum dos tratamentos com predadores (Figura 4.4), tanto na média geral do período, quanto em nenhum dia de coleta (Tabela 4.4).

Figura 4.4 – Densidade (média ± EP) de *D.* cf. *brevireme* nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.



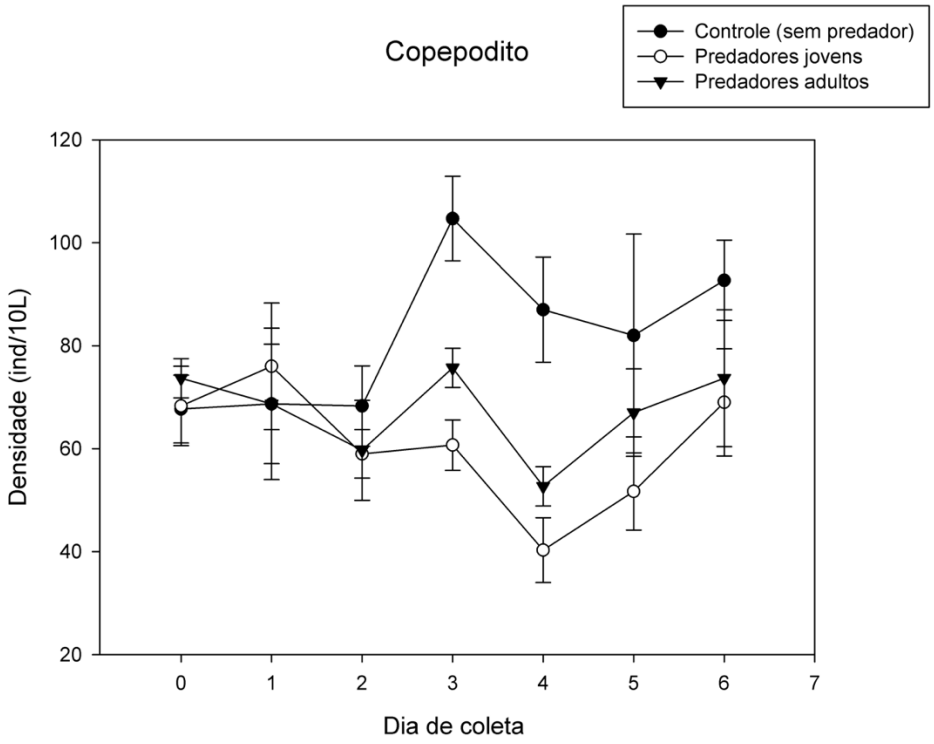
Houve um aumento na densidade de náuplios até o dia 2 de coleta. Posteriormente, houve diminuição brusca na densidade dos tratamentos até o dia 4, quando voltaram a aumentar novamente até o final do período (Figura 4.5). Houve diferenças significativas (Tabela 4.4) na densidade média do tratamento PJ em relação ao tratamento controle (C) do dia 2 ao dia 6 de coleta, exceto no dia 5, quando não houve diferença estatística. Para o tratamento PA, houve diferença estatística significativa da densidade em relação ao controle nos dias 3, 4 e 6 (Tabela 4.4).

Figura 4.5 – Densidade (média ± EP) de náuplios nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.



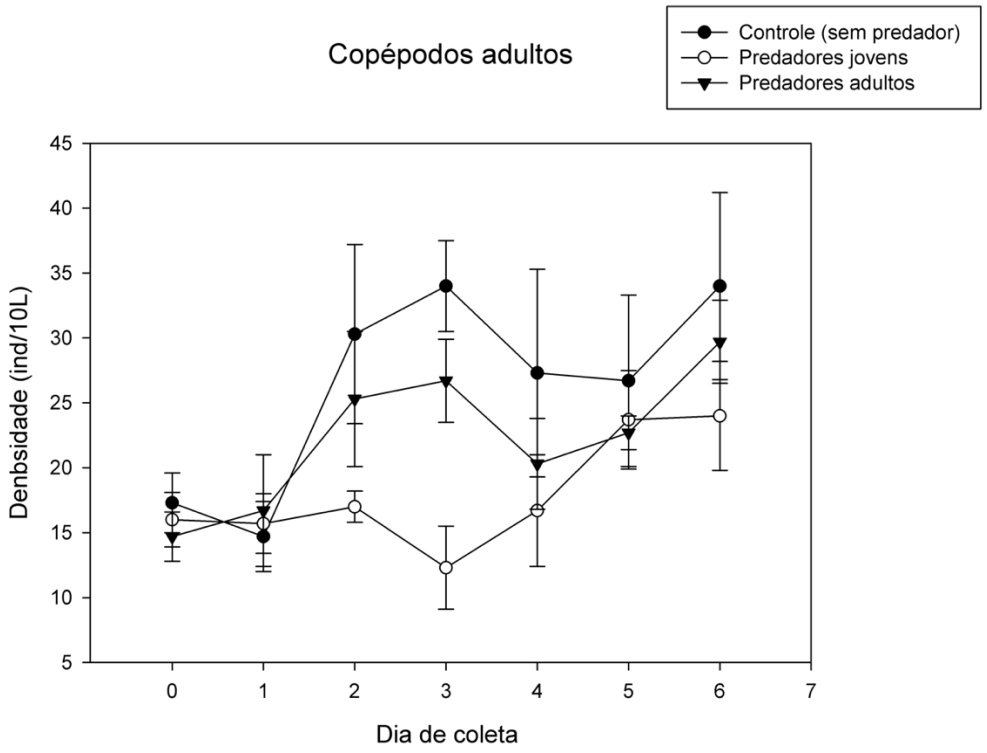
A densidade de copepodito permaneceu praticamente constante nos dois primeiros dias, seguido de uma alternância entre aumento e diminuição nos dias seguintes (Figura 4.6). Nos dias 1 e 2 não houve diferenças entre os tratamentos, contudo a partir do terceiro dia, o tratamento PJ apresentou diferenças significativas em relação ao tratamento controle nos dias 3,4 e 5, e o tratamento PA nos dias 3 e 4 (Tabela 4.4).

Figura 4.6 – Densidade (média ± EP) de copepoditos nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA durante as coletas nos dias 0 – 6.



A densidade de copépodos adultos teve um significativo aumento durante os 3 primeiros dias, exceto no tratamento PJ. Ocorreram diferenças significativas entre o tratamento PJ e o controle somente nos dias 2 e 3 (Tabela 4.4). Já para o tratamento PA, não houve diferença significativa em relação ao controle em nenhum dia (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Densidade (média ± EP) de copépodos adultos nos tratamentos controle (C), com predadores jovens (PJ) e predadores adultos (PA) durante as coletas nos dias 0 – 6.



No geral, não houve diferenças estatísticas significativa entre os tratamentos de nenhuma espécie nos dois primeiros dias do experimento (Tabela 4.4). Os efeitos da predação sobre copepoditos e náuplios foram mais acentuados entre os dias 3 e 4, enquanto que para copépodos adultos foram nos dias 2 e 3. Já para os cladóceros o efeito foi mais acentuado nos dias 4 a 6, exceto para *D.* cf. *brevireme* que não teve efeito da predação em nenhum dia. Ao contabilizar o número de ocorrências de $p < 0,05$ na tabela 4.4, é possível inferir que a comparação entre tratamentos que obteve o maior número de ocorrências foi C-PJ, com 17 ocorrências, enquanto que o C-PA obteve 6 ocorrências. Em relação às espécies, em ordem decrescente de ocorrências de $p < 0,05$, foram náuplios, com 7, copepoditos e *D. gessneri* com 5, *C. richardi* com 4 e *D.* cf. *brevireme* com nenhuma.

4.4 Discussão

Os resultados do experimento em mesocosmo evidenciaram que o predador *M. uruguayensis* é um possível agente estruturador de comunidades zooplanctônicas na zona litorânea de um lago tropical raso, corroborando as hipóteses de Domingos e Arcifa (2017a). As populações de *D. gessneri*, *C. richardi* e copépodos responderam aos efeitos dos predadores no experimento, sendo que o efeito mais acentuado foi de predadores jovens, já que as ocorrências de $p < 0,05$ foram mais frequentes do que para os adultos nos testes de Tukey apresentados na Tabela 4.4. Esses resultados também concordam com os resultados dos experimentos de Domingos e Arcifa (2017a) com as mesmas espécies e com os resultados do Capítulo II, além de outros trabalhos que também demonstraram maior impacto da predação de notonectídeos jovens sobre espécies zooplanctônicas (Scott and Murdoch 1983; Murdoch and Scott 1984). Em relação à seletividade, os resultados deste experimento também corroboram com os resultados do capítulo II, onde *D. gessneri, C. richardi* e copépodos tiveram índices de eletividade maiores que *D.* cf. *brevireme.* Além de *D.* cf. *brevireme* ser uma das menores espécies, o que dificulta a visualização e detecção pelo predador, gerando menor seletividade, também existe o fator da baixa densidade obtida no mesocosmo, o que torna ainda mais improvável o contato entre predador e presa. Para os copépodos adultos o efeito da predação foi um dos mais baixos no experimento em mesocosmo, assim como a eletividade do predador foi baixa quando comparada com os cladóceros (capítulo II).

A grande exceção ocorreu para os náuplios, que tiveram o maior efeito negativo da predação entre todas as presas do experimento em mesocosmo. Quando comparado com outros estudos, o efeito da predação sobre copépodos foi muitas vezes menor que em cladóceros ou ainda inexistente. Por exemplo, em Gonzáles Sagrario et al. (2009), cladóceros sofreram efeitos da predação do notonectídeo enquanto que os copépodos ciclopóides não, assim como em Gilbert e Burns (1999), que demonstraram uma tendência do notonectídeo *Anisops wakefieldi* em predar cladóceros mais eficientemente do que copépodos, com uma taxa de ingestão de copépodos de 10,7 a 43,5 indivíduos por dia, enquanto a taxa de ingestão de cladóceros no presente estudo foi de 28,1 a 138,9 indivíduos por dia, dependendo do tamanho das presas e dos predadores nos recipientes do experimento. No Lago Monte Alegre, apesar de predadores diferentes, o trabalho de Castilho-Noll e Arcifa (2007) demonstrou que a predação de *Chaoborus* também não afetou as populações de copépodos, embora as estruturas do mesocosmo fora ancoradas na zona limnética (aproximadamente 5 m de profundidade). Sendo assim, a migração vertical dos copépodos (Ohman et al. 1983; Neill 1990; Perticarrari

et al. 2004; Minto et al. 2010) pode ter sido um dos fatores, entre outros, que contribuíram para ausência do efeito negativo da predação de Chaoboridae. No presente trabalho as estruturas do mesocosmo foram ancoradas na zona litorânea a 1 m de profundidade, o que torna a migração dos copépodos ineficiente, ainda mais que notonectídeos são capazes de mergulhar até 0,5 m de profundidade em busca de suas presas (Streams 1992).

Outro fator que diminui a vulnerabilidade em copépodos está relacionada à sua locomoção (Cooper et al. 1985), sendo que a velocidade da movimentação aumenta com o estádio de desenvolvimento (Buskey et al. 2002; Bradley et al. 2013), ou seja, náuplios são mais vulneráveis aos predadores que os copepoditos e adultos, como mostraram os resultados. A densidade de presas também pode influenciar a seletividade do predador, como reportado por Eitam e Blaustein (2010). Dessa forma, as chances de encontros entre predador e as presas mais abundantes são maiores. Porém esse argumento entra em conflito com os resultados do capítulo II, já que nas coletas de abril de 2015 , *D.* cf. *brevireme* mesmo sendo muito abundante, foi a espécie menos eletiva pelo predador.

No experimento com mesocosmo, não havia macrófitas aquáticas que poderiam servir como refúgio para as presas, podendo ser um terceiro fator pode ter influenciado os resultados. A eficácia das macrófitas como áreas de refúgio para presas zooplanctônicas depende de vários fatores, incluindo a arquitetura da planta, tamanho, forma e densidade dos fragmentos, e também dos predadores que hospedam (Schriver et al. 1995). Mas ainda assim, é de se esperar que ajudem a promover abrigo contra predação (Genkai-Kato 2007; Cazzanelli e Warming 2008). Então pelo fato do mesocosmo não ter plantas como refúgio, o que seria praticamente impossível replicar no experimento, visto que *Ludwigia* é uma macrófita enraizada, o efeito da predação pode ter sido superestimado, posto que as presas estavam mais vulneráveis quando sem opções de refúgios para sua proteção. Os dados do Capítulo II apoiam esta ideia, já que *D.* cf. *brevireme* foi muito abundante em abril de 2015, e apesar de terem sido encontrados vestígios de DNA no tubo digestório dos predadores, a eletividade foi a menor. Os fatores que contribuíram para este resultado provavelmente estão relacionados ao seu pequeno tamanho, seu modo de natação rápido e a presença de macrófitas aquáticas para se abrigar. Já no experimento em mesocosmo, náuplios foram os que mais sofreram efeito da predação. Mas neste caso, a alta densidade populacional e a ausência de plantas para se refugiarem, podem ter sido os fatores que determinaram estes resultados. Sendo assim, estes aspectos apontados evidenciam a dificuldade de recriar hábitat em um experimento, mesmo que seja feito *in situ.* Ainda assim, o desenho do experimento conseguiu mimetizar da melhor forma a condição natural do hábitat, e mesmo tendo problemas de design, como qualquer

experimento, ainda assim, simula com muita similaridade o hábitat natural, melhor que em experimentos de predação em laboratório, feitos em pequenos recipientes, onde se oferecem determinadas presas aos predadores, em densidades pré-determinadas, e sem a variação natural de alguns parâmetro do ambiente, que dificilmente são replicáveis em laboratório.

O resultado de maior impacto em náuplios que em outras espécies maiores contradiz o que alguns trabalhos sobre predação de notonectídeos têm postulado, de que há uma seletividade mais acentuada por presas maiores (Zaret 1980; Cooper 1983; Scott e Murdoch 1983; Murdoch e Scott 1984; Gilbert e Burns 1999; Gergs e Ratte 2009). Como demonstrado no capítulo II, houve de fato uma correlação positiva entre o tamanho das presas e a preferência do predador, assim como neste trabalho, se a comparação for feita entre os cladóceros *C. richardi* e *D. gessneri*. Por isso é importante salientar que o tamanho da presa não é o único fator a ser considerado na seletividade e preferência alimentar de um predador. Como mencionado anteriormente, a densidade populacional e a estrutura do hábitat também podem influenciar (Hall et al. 1976; Peckarsky 1982; Cooper et al. 1985; Hanazato e Yasuno 1989; Perticarrari et al. 2004; Gonzáles Sagrario et al. 2009; Eitam e Blaustein 2010)

Apesar de ser difícil excluir predadores não desejados nos experimentos de mesocosmo sem excluir as presas (Mumm 1997; Castilho-Noll e Arcifa 2007), este experimento foi bem-sucedido em excluir as larvas de Chaoboridae, ácaros e outros predadores, já que nenhum predador que não fosse *M. uruguayensis* foi encontrado nas amostragens. Além da malha de 1mm colocada na boca das unidades do mesocosmo no momento do enchimento, outros dois fatores que contribuíram foi o período em que foi executado o experimento (agosto), quando a densidade populacional das larvas de Chaoboridae é normalmente baixa (Arcifa et al. 1992; Arcifa 1997; Arcifa 2000). A região do lago onde foram fixadas as estruturas (zona litorânea) também apresenta baixa densidade populacional de larvas desse predador. Souza et al. (2017), em um trabalho realizado no Lago Monte Alegre, demonstraram que as larvas de Chaoboridae habitam a zona limnética, e poucos indivíduos são encontrados na zona litorânea.

Durante os 6 dias de experimento, a oferta alimentar para as espécies zooplanctônicas não foi um fator limitante para seu crescimento, já que as populações de todas as espécies do tratamento controle (sem efeito de predação) praticamente tiveram um aumento populacional no dia 6, quando comparado com o dia 0.

Em conclusão, os notonectídeos associados à região litorânea podem efetivamente reduzir a densidade do zooplâncton. Ainda que o mesocosmo não seja capaz de recriar a totalidade das condições da zona litorânea, os resultados mostraram que de fato esses

predadores podem se alimentar do zooplâncton presente na zona litorânea, podendo ser uma fonte de alimento para esses insetos aquáticos e, como consequência, regular as populações dessas espécies de presas. Aspectos relacionados ao tamanho corporal, densidade populacional, capacidade de evasão e diminuição da sobreposição entre predador e presa são fundamentais no padrão de seletividade e a preferência alimentar do notonectídeo *M. uruguayensis*.

REFERÊNCIAS

ARCIFA, M.S., 1997. Fluctuation and vertical migration of *Chaoborus* in a tropical Brazilian reservoir: Lake Monte Alegre. *Acta Limnologica Brasiliensia* . Vol. 9, 93–103.

ARCIFA, M.S., 2000. Feeding habits of Chaoboridae larvae in a tropical Brazilian reservoir. *Revista Brasileira de Biologia* = Brazilian Journal of Biology. Vol. 60(4), 591–597.

ARCIFA, M.S., A.J. MESCHIATTI and E.A.T. GOMES, 1990. Thermal regime and stability of a tropical shallow reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*. Vol. 23(4), 271–281.

ARCIFA, M.S. and A.J. MESCHIATTI, 1993. Distribution and feeding ecology of fishes in a Brazilian reservoir: Lake Monte Alegre. *Interciencia*. Vol. 18(6), 83–87.

ARCIFA, M.S. and W. GUAGNONI, 2003. A new model of enclosure for experiments in lentic water. *Acta Limnologica Brasiliensia*. Vol. 15(1), 75–79.

ARNÉR M., S. KOIVISTO, J. NORBERG and N. KAUTSKY, 1998. Trophic interactions in rockpool food webs: regulation of zooplankton and phytoplankton by *Notonecta* and *Daphnia*. *Freshwater Biology.* Vol. 39, 79–90.

BAILEY, P.C.E., 1987. Abundance and age-specific spatial and temporal distribution in two waterbug species, *Anisops deanei* (Notonectidae) and *Ranatra dispar* (Nepidae) in three farm dams in South Australia. *Oikos.* Vol. 49(1), 83–90.

BENNETT, D.V. and F.A. STREAMS, 1986. Effects of vegetation on *Notonecta* (Hemiptera) distribution in ponds with and without fish. *Oikos.* Vol. 46(1), 62–69.

BLAUSTEIN, L., 1998. Influence of the predatory backswimmer *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecological Entomology.* Vol. 23, 246–252.

BRADLEY, C.J., J.R. STRICKLER, E.J. BUSKEY and P.H. LENZ, 2013. Swimming and escape behavior in two species of calanoid copepods from nauplius to adult. *Journal of Plankton Research*. 2013. Vol. 35(1), 49–65.

BROOKS, J.L., 1968. The effects of prey size selection by lake planktivores. *Systematic Biology.* Vol. 17(3), 273–291.

BROOKS, J.L. and S.I. DODSON, 1965. Predation, body size, and composition of plankton. *Science*1. Vol. 50(3692), 28–35.

BUSKEY, E.J., P.H. LENZ and D.K. HARTLINE, 2002. Escape behavior of planktonic copepods in response to hydrodynamic disturbances: High speed video analysis. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 235, 135–146.

CASSANO, C.R., M.S.M. CASTILHO-NOLL and M.S. ARCIFA, 2002. Water mite predation on zooplankton of a tropical lake. *Brazilian Journal of Biology.* Vol. 62(4A), 565–571.

CASTILHO-NOLL, M.S.M. and M.S. ARCIFA, 2007. Mesocosm experiment on the impact of invertebrate predation on zooplankton of a tropical lake. *Aquatic Ecology.* Vol. 41, 587–598.

CAZZANELLI, M., T.P. WARMING and K.S. CHRISTOFFERSEN, 2008. Emergent and floating-leaved macrophytes as refuge for zooplankton in a eutrophic temperate lake without submerged vegetation. *Hydrobiologia*. Vol. 605(1), 113–122.

COOPER, S.D., 1983. Selective predation on cladocerans by common pond insects. *Canadian Journal of Zoology*. Vol. 61(4), 879–886.

COOPER, S.D., D.W. SMITH and J.R. BENCE, 1985. Prey selection by freshwater predators with different foraging strategies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 42, 1720–1732.

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017a. Distribution and fluctuations of backswimmers (Notonectidae) in a tropical shallow lake and predation on microcrustaceans. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*. Vol. 77(1), 108–117.

DOMINGOS, A.R. and M.S. ARCIFA, 2017b. Spatial and temporal distribution of gerrid (Heteroptera) and predation on microcrustaceans from a tropical shallow lake. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, Vol. *77*(2), 289–298.

EITAM, A. and L. BLAUSTEIN, 2010. Effects of predator density and duration of predator occupancy on crustacean abundance and diversity in experimental pools. *Hydrobiologia*. Vol. 652, 269–276.

FISCHER S., D. PEREYRA and L. FERNÁNDEZ, 2012. Predation ability and non-consumptive effects of *Notonecta sellata* (Heteroptera: Notonectidae) on immature stages of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology.* Vol. 37(1), 245–251.

FISCHER, S., G. ZANOTTI, A. CASTRO, L. QUIROGA et al., 2013. Effect of habitat complexity on the predation of *Buenoa fuscipennis* (Heteroptera: Notonectidae) on mosquito immature stages and alternative prey. *Journal of Vector Ecology*. Vol. 38(2), 215–223.

FOLTZ, S.J. and S.I. DODSON, 2009. Aquatic Hemiptera community structure in stormwater retention ponds: a watershed land cover approach. *Hydrobiologia.* Vol. 621(1), 49–62.

GENKAI-KATO, M., 2007. Macrophyte refuges, prey behaviour and trophic interactions: Consequences for lake water clarity. *Ecology Letters*. Vol. 10(2), 105–114.

GERGS, A. and H.T. RATTE, 2009. Predicting functional response and size selectivity of juvenile *Notonecta maculata* foraging on *Daphnia magna*. *Ecological Modelling*. Vol. 220, 3331-3341.

GILBERT, J.J., C.W. BURNS and C.C. GILBERT, 1999. Summer distribution patterns of the backswimmer, *Anisops wakefieldi* (Hemiptera: Notonectidae), in a New Zealand pond. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* Vol. 33, 661–672.

GILBERT, J.J. and C.W. BURNS, 1999. Some observations on the diet of the backswimmer, *Anisops wakefieldi* (Hemiptera: Notonectidae). *Hydrobiologia*. Vol. 412, 111–118.

GLIWICZ, Z.M. and J. PIJANOWSKA. The role of predation in zooplankton succession. In: Sommer U (ed) *Plankton ecology*. *Succession in plankton communities*. Springer-Verlag, New York: 1989.

GONZÁLES SAGRARIO, M.A., E. BALSEIRO, R. ITUARTE and E. SPIVAK, 2009. Macrophytes as refuge or risky area for zooplankton: a balance set by littoral predacious macroinvertebrates. *Freshwater Biology*. Vol. 54(5), 1042–1053.

HALL, D.J., S.T. THRELKELD, C.W. BURNS and P.H. CROWLEY, 1976. The size-efficiency hypothesis and the size structure of zooplankton communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 7, 177–208.

HAMPTON, S.E. and J.J. GILBERT, 2001. Observations of insect predation on rotifers. *Hydrobiologia.* Vol. 446/447, 115–121.

HAMPTON, S.E., J.J. GILBERT and C.W. BURNS, 2000. Direct and indirect effects of juvenile *Buenoa macrotibialis* (Hemiptera: Notonectidae) on the zooplankton of a shallow pond. *Limnology and Oceanography*. Vol. 45(4), 1006–1012.

HANAZATO, T. and M. YASUNO, 1989. Zooplankton community structure driven by vertebrate and invertebrate predators. *Oecologia*. Vol. 81, 450–458.

HANEY, J.F. and D.J. HALL, 1973. Sugar-coated *Daphnia*: a preservation technique for Cladocera. *Limnology and Oceanography*. Vol. 18(2), 331–333.

HIRVONEN, H., 1992. Effects of backswimmer (Notonecta) predation on crayfish (Pacifastacus) young: autotomy and behavioural responses. *Annales Zoologici Fennici.* Vol. 29: 261–271

JARA, F.G., M.G. PEROTTI and M.C. DIÉGUEZ, 2012. Distribution of backswimmers in shallow ponds of Patagonia and their predatory role on a common tadpole–copepod assemblage. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* Vol. 46(4), 459–473.

LAIR, N., 1990. Effects of invertebrate predation on the seasonal succession of a zooplankton community: a two year study in Lake Aydat, France. In: DUMONT, H.J., J.G. TUNDISI and K. ROCHE, (eds) Intrazooplankton Predation. Kluwer Academic Publishers, London, pp 1–12.

LAURIDSEN, T.L. and I. BUENK, 1996. Diel changes in the horizontal distribution of zooplankton in the littoral zones of two shallow eutrophic lakes. *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 137, 161–176.

LEWIS JR., W.M, 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 40(10), 1779–1787.

MINTO, W.J., M.S. ARCIFA and A. PERTICARRARI, 2010. Experiments on the influence of *Chaoborus brasiliensis* Theobald, 1901 (Diptera: Chaoboridae) on the diel vertical

migration of microcrustaceans from Lake Monte Alegre. *Brazilian Journal of Biology.* Vol. 70(1), 25–35.

MUMM, H., 1997. Effects of competitors and *Chaoborus* predation on the cladocerans of a eutrophic lake: an enclosure study. *Hydrobiologia*. Vol. 360, 253–264.

MURDOCH, W.W. and M.A. SCOTT, 1984. Stability and extinction of laboratory populations of zooplankton preyed on by the backswimmer *Notonecta*. *Ecology*. Vol. 64(4), 1231–1248.

NESBIT, L.M., H.P. RIESSEN and C.W. RAMCHARAN, 1996. Opposing predation pressures and induced vertical migration responses in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography.* Vol. 41(6), 1306–1311.

NEILL, W.E., 1990. Induced vertical migration in copepods as a defense against invertebrate predation. *Nature.* 345(6275), 524–526

OHMAN, M.D., B.W. FROST and E.B. COHEN, 1983. Reverse diel vertical migration: an escape from invertebrate predators. *Science*. Vol. 220(4624),1404–1407.

PECKARSKY, B.L., 1982. Aquatic insect predator-prey relations. *Bioscience.* Vol. 32(4), 261–266.

PERTICARRARI, A., M.S. ARCIFA and R.A. RODRIGUES, 2004. Diel vertical migration of copepods in a Brazilian lake: a mechanism for decreasing risk of *Chaoborus* predation? *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 64(2), 289–298.

PLASKA, J. and T. MIECZAN, 2018. Effects of water bugs on crustacean zooplankton in a shallow littoral zone. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*. Vol. 419(6), 1–7.

SAHA, N., G. ADITYA, G.K. SAHA and S.E. HAMPTON, 2010. Opportunistic foraging by heteropteran mosquito predators. *Aquatic Ecology.* Vol. 44(1), 167–176.

SCHRIVER, P., J. BØGESTRAND, E. JEPPESEN and M. SØNDERGAARD, 1995. Impact of submerged macrophytes on fish-zooplankton-phytoplankton interactions: large scale enclosure experiments in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biology*. Vol. 33(1), 255–270.

SCOTT, M.A. and W.W. MURDOCH, 1983. Selective predation by the backswimmer, *Notonecta*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 28(2), 352–366.

SIH, A., 1982. Foraging strategies and the avoidance of predation by an aquatic insect, *Notonecta hoffmanni. Ecology*. Vol. 63(3), 786–796.

SOUZA, B.B., M.S. ARCIFA, T.C.S FERREIRA, L.H.S. SILVA, et al., 2017. Are the littoral zone conditions suitable for tropical planktonic microcrustaceans*? International Journal of Limnology*. Vol. 53, 281–291.

STANSFIELD, J.H., M.R. PERROW, L.D. TENCH, A.J.D. JOWITT, et al., 1997. Submerged macrophytes as refuges for grazing Cladocera against fish predation: observations on seasonal changes in relation to macrophyte cover and predation pressure. *Hydrobiologia*.

Vol. 342/343, 229–240.

STREAMS, F.A., 1987a. Within-habitat spatial separation of two *Notonecta* species: interactive vs. noninteractive resource partitioning. *Ecology.* Vol. 68(4), 935–945.

STREAMS, F.A., 1987b. Foraging behavior in a notonectid assemblage. *American Midland Naturalist.* Vol. 117(2), 353–361.

STREAMS, F.A., 1992. Age-dependent foraging depths of two species of *Notonecta* (Heteroptera Notonectidae) breeding together in a small pond. *Aquatic Insects*. Vol. 14(3), 183–191.

ZARET, T.M. *Predation and Freshwater Communities*. New Haven: Yale University Press: 1980.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não restam dúvidas de que tanto o notonectídeo *M. uruguayensis* quanto o gerrídeo *R. crassifemur* se alimentam de espécies zooplanctônicas no ambiente natural. Esta conclusão é baseada na presença dos biomarcadores (DNA) das espécies de presas encontrados no tubo digestório dos predadores, ainda que não tenha sido possível inferir se estes vestígios foram provenientes de predação secundária ou se de carcaças de indivíduos mortos. Além disso, não é possível dizer somente com os dados moleculares se esses predadores têm algum efeito negativo significativo sobre as populações das presas-alvo.

Ainda que método utilizado para detectar os biomarcadores por PCR seja restrito para os casos onde se tenha um conhecimento preliminar das interações tróficas, que o número de presas e predadores sejam relativamente baixos, e não seja tão efetiva quanto o NGS, ainda assim é uma ferramenta de detecção de baixo custo que cumpre com os seus objetivos de ser relativamente rápida e precisa para identificar a nível de espécie inequivocamente vestígios de DNA das presas presentes nos tubos digestórios dos predadores, mesmo quando em pequenas concentrações.

Apesar dos testes com primers no Capítulo I comprovarem que não houve amplificação cruzada dos biomarcadores de outras espécies que não fosse a correspondente ao primer testado, eles foram efetuados somente com o DNA dos predadores e das presas-alvo que foram selecionadas para o estudo, excluindo-se assim centenas ou milhares de outras espécies presentes no ambiente. Dessa forma, nas análises com o tubo digestórios dos predadores, material genético proveniente de outras espécies que não foram testadas poderiam ter sido amplificados, o que poderia gerar falsos-positivos. Contudo os sequenciamentos dos produtos positivos de PCR provenientes dos tubos digestórios dos predadores do ambiente foram uma fonte inquestionável de que correspondiam às espécies de presas alvos do primer específico utilizado.

Tanto o experimento em mesocosmo como as análises moleculares dos tubos digestórios dos predadores do ambiente se complementam, visto que a análise molecular sozinha deixa a dúvida se o efeito de predação é significativo a ponto de influenciar negativamente e significativamente as populações das presas. Por outro lado, o experimento em mesocosmo isolado deixa a dúvida em relação ao efeito do desenho do experimento.

Como foi discutido, o isolamento de um porção do lago, ainda que seja melhor (em termos de mimetização do ambiente) que um experimento conduzido em laboratório, o mesocosmo apresenta alguns percalços como apresentado na discussão (*e.g.* ausência de macrófitas, baixa circulação de água, entre outros fatores).

A partir dos dados do presente estudo, assim como todo arcabouço de trabalhos já publicados, há embasamentos claros de que notonectídeos são agentes estruturadores de comunidades zooplanctônicas, já que as análises moleculares demonstraram vestígios de DNA das presas alvo no tubo digestório do predador, e o experimento em mesocosmo apontou que houve influência significativa dele sobre as populações das presas-alvo. Aspectos relacionados ao tamanho corporal, densidade populacional, capacidade de evasão e diminuição da sobreposição entre predador e presa são fundamentais no padrão de seletividade e a preferência alimentar do notonectídeo *M. uruguayensis*.

Contudo, em relação aos gerrídeos, com o embasamento dos resultados das análises moleculares dos tubos digestórios foi possível concluir somente que eles se alimentam de presas zooplanctônicas. O experimento em mesocosmo que responderia se de fato o gerrídeo *R. crassifemur* é capaz de influenciar significativamente as populações de presas, não foi realizado. A princípio a ideia era realizá-lo em agosto de 2017, mas por conta de imprevistos na época em que seria realizado, não foi possível. Na ocasião, a densidade populacional *de R. crassifemur* estava extremamente baixa, a ponto de serem capturados somente alguns poucos indivíduos depois de um longo tempo de coleta. Como havia demanda por um número alto de insetos para introduzir nas estruturas montadas, e também para se repor nos dias seguintes aqueles que estavam mortos, optou-se por não realizar o experimento naquele período.