

## ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLENS COLETADOS EM MARIPOSAS (LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE) PARA APLICAÇÃO EM REDES DE INTERAÇÕES

**JULIANA DE SOUZA CHAGAS<sup>1</sup>; ANDREZA LAUTENSCHLEGER<sup>2</sup>; JEFERSON VIZENTIN-BUGONI<sup>3</sup>; VERA LUCIA BOBROWSKI<sup>4</sup>; REJANE PETER<sup>5</sup>; CRISTIANO AGRA ISERHARD<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – julianaschagass @hotmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – andrezaalauten @hotmail.com*

<sup>3</sup>*University of Illinois at Urbana-Champaign – jbugoni@yahoo.com.br*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – vera.bobrowski@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – rejane peter1@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – cristianoagra@yahoo.com.br*

### 1. INTRODUÇÃO

Mariposas da família Sphingidae constituem um grupo taxonômico bastante diverso (ca. de 1.200 spp.) com ampla distribuição mundial (DE AVILA et al., 2010), sendo registradas 186 espécies para o Brasil. São organismos fundamentais na polinização, prestando serviços ambientais importantes e oferecendo subsídios para estudos ecológicos (MATOS et al., 2012).

Esfingídeos são caracterizados por sua grande capacidade de voo e probóscide longa. Essas características possibilitam a polinização de flores especializadas, com órgãos reprodutores longos, que limitam o acesso de outros animais aos recursos florais. Plantas polinizadas por esfingídeos, normalmente, apresentam uma série de características: antese floral noturna, coloração branca, corola profunda, base larga, e forte odor indicando grande quantidade de néctar, sendo classificadas como flores esfingófilas (FAEGRI & VANDER PIJL 1966).

A polinização é uma das interações ecológicas mais importantes em nível de comunidade. Ela não só conecta mais de um milhão de organismos, mas também permite a reprodução das angiospermas e a sobrevivência de grande parte dos insetos (RECH et al. 2014). Atualmente, muita atenção tem sido dada nas relações mutualísticas polinizador-planta através do uso de redes de interações que fornecem um panorama mais amplo sobre a estruturação das interações nas comunidades.

Estudos palinológicos contribuem na caracterização de grãos de pólen de diferentes espécies. Segundo JÚNIOR et al. (2006) estudos de pólen baseiam-se principalmente nas características morfológicas (tamanho, forma, aberturas e ornamentação) e na comparação destas com outros grãos de pólen. Desta forma, um dos mais importantes atributos que tornam os grãos de pólen adequados para estudos taxonômicos e sistemáticos está no fato de variarem em sua forma. Além disso, essa variação é herdável e mostra altos níveis de consistência dentro de um táxon, embora diferentes formas possam ser encontradas em uma mesma espécie (BLACKMORE, 2007). A técnica que auxilia na observação e identificação dos grãos de pólen é denominada acetólise que consiste na mistura de três ácidos (sulfúrico, lático e anidrido acético) que quando aquecidos reagem na quebra dos grãos, proporcionando assim uma melhor observação e identificação da estrutura externa do pólen (RAYNAL & RAYNAL, 1971).

O Laboratório de Ecologia de Lepidoptera (LELEP, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da UFPel) vem desenvolvendo um projeto que pretende descrever, através de observações focais, a rede de interações esfingídeo-planta em uma área de campos sulinos (LAUTENSCHLEGER, 2016).

Associar as observações focais com os pólens aderidos à probóscide e ao corpo das mariposas é importante para aumentar a abrangência desta rede e permitir uma análise mais refinada das suas interações.

Este trabalho tem como objetivo identificar os grãos de pólens encontrados em esfingídeos coletados no estudo acima citado, analisados através da técnica de acetólise para identificar possíveis interações não observadas em campo mas que ocorrem na comunidade, assim complementando a rede de interações.

## 2. METODOLOGIA

Foram realizadas saídas de campo no município do Capão do Leão nas proximidades da UFPel entre novembro de 2015 e abril de 2017 objetivando descrever a rede de interações esfingídeo-planta. Tanto as mariposas quanto as plantas polinizadas foram coletadas em campo. As mariposas foram coletadas com puçá e colocadas em envelopes, para serem devidamente identificadas e montadas no LELEP. As plantas foram coletadas e colocadas em prensas, para posterior identificação.

Para a análise de grãos de pólen foi empregada a técnica de acetólise (Aclac) (Tabela 1), realizada em uma Capela de Fluxo, descrita a seguir: com uma pipeta graduada foi colocado o anidrido acético em um Becker, e após os ácidos sulfúrico e lático que devem ser lentamente misturados. Com uma seringa é coletado pólen da probóscide e do corpo das mariposas. Em seguida colocou-se o pólen coletado em uma lâmina, acrescentando uma ou mais gotas da solução de acetólise. A lâmina foi aquecida por três minutos, para que o processo de quebra dos grãos de pólen tivesse início. Após este procedimento, observou-se no microscópio se o conteúdo polínico saiu do grão. Ao término desta parte, foram colocadas uma gota de álcool e uma gota d'água morna, que posteriormente tiveram o excesso retirado com um papel absorvente. A finalização do processo de acetólise se deu com a colocação de gelatina glicerinada para fixação e conservação do material em lâmina. A gelatina glicerinada foi preparada com folhas de gelatina sem sabor, nas medidas de uma folha (2,0 g) para cada 100 mL de água quente e 100 mL de glicerina. Após estas lâminas foram observadas no microscópio para análise e identificação dos grãos de pólen. As lâminas obtidas a partir de pólens coletados nos esfingídeos coletados foram comparados com a coleção palinológica de referência produzida nesse trabalho, visando investigar a existência ou não de espécies que ainda não estiveram na rede de interações montadas a partir de ‘observações focais’.

Tabela 1: Protocolo Aclac de acetólise utilizado para a análise de grãos de pólen das mariposas coletadas no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, entre novembro de 2015 e abril de 2017.

ACLAC	40	60
Anidrido acético	5,0 (1,25 ml)	3,0 (0,75 ml)
Ácido sulfúrico	1,0 (0,25 ml)	1,0 (0,25 ml)
Ácido lático	4,0 (1,0 ml)	6,0 (1,5 ml)

Legenda: Pólens frágeis: aclac 40 e pólens fortes: aclac 60.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 402 horas de esforço amostral em campo, onde ocorreu a observação de 18 espécies de plantas, destas 13 espécies foi registrada a

visitação de 17 espécies de Sphingidae. Em relação à rede de interações foram registradas 233 interações de esfingídeos-planta e 46 links (interação entre uma espécie de planta com uma espécie de animal) através do método de observação focal (LAUTENSCHLEGER et al. 2016)

Até o momento foram montadas e analisadas 77 lâminas, sendo 64 lâminas de extrações de grãos de pólen das mariposas e 13 lâminas de extração de grãos de pólen das flores observadas (lâminas-referência). Tivemos como resultado uma vasta quantidade de pólens da planta esfingófila *Oenothera ravenii* W. Dietr. (Figura 1), em algumas destas lâminas ocorreu a presença de grãos das famílias Asteraceae, Melastomataceae e Celastraceae, entre outros tipos de pólens que ainda não foram identificados. Foi observado que as lâminas com grãos de pólens distintos são de três esfingídeos: *Manduca florestan* (Stoll, 1782), *Manduca contracta* (Butler, 1875) e *Eumorpha vitis* (Linnaeus, 1758). Também foi observada uma lâmina com grãos de duas espécies de plantas observadas previamente na rede de interações, pressupondo-se que este Sphingidae (*Manduca florestan* (Stoll, 1782)) visitou duas espécies (*Oenothera ravenni* e *Brugmansia suaveolens* (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) Bercht. & J.Presl, 1823) de flores esfingófilas em uma mesma noite. Lâminas montadas a partir de *Aellopos tantalus* não apresentaram pólen.

A análise e identificação destes grãos de pólen em nível de espécie permitirão verificar se as espécies de plantas estão na área de estudo das observações focais, ou se os pólens aderidos nas espécies de Sphingidae são de plantas de localidades mais distantes. Desta forma, espera-se agregar mais informações à rede de interações complementando e tornando mais acurada a descrição das interações na comunidade (LAUTENSCHLEGER et al., 2016).



Figura 1: A) Flor de *Oenothera ravenii*. B) Grãos de Pólen de *Oenothera ravenii*. (Microscópio Óptico)

#### 4. CONCLUSÕES

Os pólens encontrados nas lâminas em geral condizem com a observação de campo. O reconhecimento e identificação de grãos de pólens de espécies de plantas distintas das registradas na rede de interações ‘focal’ e sugere que a técnica de acetólise é eficiente para detectar novas interações e pode informar sobre as interações mutualísticas entre esfingídeos e plantas. Pretende-se continuar com os estudos já em andamento visando a formação de uma palinoteca dos pólens aderidos e coletados das mariposas, visando a elaboração de uma coleção de referência com pólens da região do estudo. Tais informações são fundamentais para identificar outros recursos usados por mariposas nas

áreas estudadas, se possuem características esfingófilas, ou se a deposição de pólen ocorreu acidentalmente sem que haja a polinização, por encontrar-se próxima as flores com características da síndrome de esfingofilia, ou devido à colisão da mariposa nestas plantas durante o voo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic Keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**.v.263.p.3-12. 2007.

CUDA, J. P., A. P. FERRITER, V. MANRIQUE, MEDAL, J.C. Brazilian Pepper tree Task Force Chair. Interagency Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius*) Management Plan for Florida. 2ed. 2006.

DE AVILA, Rubem Samuel Junior. et.al. Tipos polínicos encontrados em esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) em área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil: uso da palinologia no estudo de interações ecológicas. São Paulo: **Revista Brasil. Bot.**, v.33, n.3. 2010. 424p.

FAEGRI K., VAN DER PIJL, L., 1966: **The principles of pollination ecology**. – Oxford: Pergamon Press.

FREITAS, Leandro. VIZENTIN-BUGONI, Jeferson. WOLOWSKI, Marina. SOUZA Jana Magaly Tesserolli. VARASSIN, Isabela Galarda. Interações planta-polinizador e a estruturação das comunidades. In: RECH, André Rodrigo. AGOSTINI, Kayna. OLIVEIRA, Paulo Eugênio. MACHADO, Isabel Cristina. (Org.). **Biologia da polinização**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2014. Pág 373.

LAUTENSCHLEGER, Andreza; CAVALHEIRO, Lis; CHAGAS, Juliana; VIZENTIN-BUGONI, Jeferson; ISERHARD; Cristiano. Fatores Estruturadores de uma Rede de Interações Esfingídeo-Planta no Extremo Sul do Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, dia., 2016, Pelotas. **Anais...Pelotas: UFPEL, 2016.**

MATOS, Simone Jung. et al. Diversidade, similaridade e composição de espécies de Sphingidae em quatro áreas de Cerrado. Anais do IV Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Anais do IV Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.**, v.1, p. 56-57. 2012.

RAYNAL, A. & RAYNAL, J. 1971. **Une technique de préparation des grains de pollen fragiles**. Adansonia 11: 77-79.

RECH, André Rodrigo. WESTERKAMP, Christian. Biologia da polinização: uma síntese histórica. In: RECH, André Rodrigo. AGOSTINI, Kayna. OLIVEIRA, Paulo Eugênio. MACHADO, Isabel Cristina. (Org.). **Biologia da polinização**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2014. Pág 24.