



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Ecologia

**Evolução das interações entre o complexo de
espécies de *Actinote* (Lepidoptera, Nymphalidae) e
suas plantas hospedeiras.**

RICARDO GABRIEL MATTOS

Brasília-DF

2016

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ecologia

Evolução das interações entre o complexo de espécies
de *Actinote* (Lepidoptera, Nymphalidae) e suas plantas
hospedeiras.

RICARDO GABRIEL MATTOS

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Rezende Diniz

Co-orientadora: Profa. Dra. Lilian Giugliano

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ecologia do
Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília como
requisito para obtenção do título de
doutorado em Ecologia.

Brasília-DF

2016

“Sente-se em outra cadeira no outro lado da mesa. Mais tarde, mude de mesa...o mais importante é a mudança, o movimento...a salvação é pelo risco, sem o qual a vida não vale a pena.”

Clarice Lispector - *Mudança*

Agradecimentos

Desde o início deste doutorado o interesse maior foi o de aproveitar o processo e o que se poderia obter em conhecimento e aprendizado. Desta forma, ao longo desses anos muitas pessoas contribuíram de maneira direta e indireta para que minha formação profissional, nesse sentido, fosse completa.

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Profa. Dra. Ivone Rezende Diniz, pelo exemplo de profissionalismo e caráter que ela representa para essa Instituição e em toda comunidade acadêmica. Por todo apoio ao projeto e dedicação, deixo aqui minha admiração.

A co-orientadora Profa. Dra. Lilian Giugliano pelos comentários ao longo desses anos e por permitir o acesso ao seu laboratório. Aos membros da banca, Prof. Dr. Ronaldo Francini, por compartilhar seus conhecimentos sobre a biologia e ecologia das *Actinote*. Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Motta, pela oportunidade de aprender junto a ele o ofício de lecionar. Ao Prof. Fernando Pacheco Rodrigues com quem tive a oportunidade de conviver no dia a dia do laboratório de genética. Ao Prof. Dr. Antonio Aguiar pelos comentários e discussões aleatórias ao longo desses anos. Ao Prof Dr. José Roberto Pujol pelo suporte e críticas.

Agradeço o Dr. Lee Dyer por todo o suporte dado durante minha visita a Universidade de Reno, Nevada, EUA, bem como a todos os docentes e estudantes do Departamento de Ecologia, Evolução e Biologia da Conservação (EECB).

Aos amigos que fiz e que foram muitos, com quem tive o prazer de conviver desde minha chegada em Brasília. Companheiros de República,

Raymundo, Samuel, Carla, Thiago, Pedro, Diego com quem dividi moradia e pude ter boas conversas. Aos colegas e amigos do Programa de Pós graduação em Ecologia, Leonardo Machado, Alexandre Portela e Clarisse e todos aqueles que de alguma forma contribuíram com comentários e sugestões. Aos amigos do Laboratório de Biologia de Insetos Herbívoros, Cintia Lepsqueur, Thayane Pereira e Hanna Pamela pelo auxílio no laboratório. Ao amigo e parceiro Geraldo Junior. Aos amigos do Laboratório de Genética e Biodiversidade pelo apoio e companheirismo.

A Bruna Drumond Silveira, uma pessoa especial, pela parceria incondicional, amizade e, sobretudo por tornar melhores os meus dias ao longo desses anos. Não só por ter participado diretamente, mas, principalmente por sua presença constante, dedico a ela grande parte deste trabalho.

Por ultimo, e o mais importante, à minha família. Meus irmãos, pais e avos sempre presentes e interessados, apoiaram de todas as maneiras imagináveis esta etapa de minha formação como cientista.

A Universidade de Brasília, representado pelo Decanato de Pesquisa e Pós-graduação pelo apoio institucional e financeiro. Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e todo seu corpo docente, pelas experiências aqui vivenciadas. Ao CNPq e CAPES, agencias financiadoras da bolsa e do projeto.

A todos, muito obrigado.

Sumario

Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
Capitulo I - Padrão de oviposição e evolução da oligofagia em um complexo de espécies do gênero <i>Actinote</i> (Lepidoptera: Nymphalidae).	
Introdução.....	25
Metodologia.....	28
Resultados.....	31
Discussão	35
Referências	39
Capitulo II - Biogeografia histórica e filogeografia do uso de plantas hospedeiras em um complexo de espécies do gênero <i>Actinote</i> (Lepidoptera: Nymphalidae).	
Introdução.....	42
Metodologia.....	45
Resultados.....	48
Discussão	57
Referências.....	61
Capitulo III - Variação geográfica, uso de plantas hospedeiras e estrutura genética de <i>Actinote pyrrha</i> (Nymphalidae: Acraeini)	
Introdução.....	65
Metodologia.....	67
Resultados.....	69
Discussão	74
Referências.....	77
Considerações finais	80
Anexos	82

Índice de tabelas

Tabela 1. Registros das 23 espécies de <i>Actinote</i> no Brasil e suas plantas hospedeiras.....	18
---	-----------

Capítulo 1

Tabela 1.1. Resultados da análise de variância das medidas das características ambientais nos 12 sítios amostrados.....	32
--	-----------

Tabela 1.2. Resumo dos resultados da análise de modelos mistos generalizados. Número de oviposição encontrado para cada uma das espécies de <i>Actinote</i> , em função do gênero e da densidade da planta (fator fixo), em cada sítio (fator aleatório).....	33
--	-----------

Capítulo 2

Tabela 2.1. Índices de diversidade nucleotídica e polimorfismo estimados por <i>locus</i> e por espécies, nas 12 localidades amostradas	50
--	-----------

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. Mapa representando a localização dos sítios de coletas29

Figura 1.2. Número total de oviposição ou agrupamentos de larvas de *A. melanisans*, *A. pelleneae*, *A. carycina*, e *A. pyrrha* em maio, outubro e dezembro de 2013, nos 12 sítios amostrados..... 31

Figura 1.3. Resultados das análises discriminantes de redundância. (A) espécies de *Actinote* em função do número de grupos de ovos ou lagartas encontradas em cada gênero de planta hospedeira e as variáveis ambientais (B) correlação entre variáveis ambientais e densidade de cada gênero de plantas em cada sítio..... 33

Figura 1.4. Box plots dos valores de Z resultados das análises de modelos lineares generalizados mistos para o padrão de oviposição de uma espécie e o efeito interespecífico de grupos de ovos ou lagartas nas quatro plantas hospedeiras estudadas 35

Capítulo 2

Figura 2.1. Mapa representando os sítios onde foram coletadas as larvas de *Actinote melanisans*, *A. pelleneae*, *A. carycina*, e *A. pyrrha*, em março, outubro e novembro de 201346

Figura 2.2. Reconstrução filogenética bayesiana de parte do gene citocromo oxidase no gênero *Actinote*51

Figura 2.3. Reconstrução filogenética das espécies de *Actinote* baseada na genealogia do (A) gene mitocondrial e (B) gene nuclear52

Figura 2.4. Distribuição dos haplótipos ao longo das diferentes espécies de *Actinote*, nos genes mitocondrial (A) e nuclear (B).....53

Figura 2.5. Correlação entre amplitude de dieta e o número de haplótipos dos genes nuclear e mitocondrial em cada uma das quatro espécies de *Actinote* estudadas54

Figura 2.6. Cenários históricos usados para avaliar as relações entre as regiões do Litoral (LIT), Serra do Mar (MAR), Serra da Mantiqueira (MAN), Serra da Canastra (CAN) e do Distrito Federal (DF)55

Figura 2.7. Cenários usados para avaliar as relações entre as linhagens de *A. pyrrha* encontradas nos quatro diferentes gêneros de plantas hospedeiras.. 56

Figura 2.8. Média e desvio padrão da densidade de cada um dos quatro gêneros de plantas hospedeiras em quatro diferentes regiões57

Capítulo 3

Figura 3.1. Mapa indicando as localidades onde foram coletadas as populações de *Actinote pyrrha*, entre maio e dezembro de 2013.....68

Figura 3.2. Distribuição geográfica das probabilidades das populações pertencerem a um ou outro grupo genético 71

Figura 3.3. Densidade da probabilidade do número de “clusters” ao longo da cadeia de Markov-Monte Carlo 71

Figura 3.4. Preferência por plantas hospedeiras nas populações. As curvas indicam probabilidade posterior de preferência das populações de *Actinote pyrrha* nos quatro gêneros de plantas hospedeiras72

Figura 3.5. Resultado da análise multivariada de componentes principais (PCA), mostrando a distribuição das populações de *A. pyrrha* no espaço multidimensional de probabilidade de preferência por plantas e de agrupamento genético. (B) contribuição dos vetores agrupamento genético e probabilidade de oviposição..... **73**

Figura 3.6. Probabilidade média de preferência de oviposição ao longo dos três agrupamentos genéticos **73**

Resumo

Neste trabalho são investigadas algumas características ecológicas e evolutivas das interações entre um complexo de espécies do gênero *Actinote* (Lepidoptera, Nymphalidae) e as plantas hospedeiras. Foi utilizada uma abordagem integrada, em diferentes níveis taxonômicos, baseada na análise de dados da distribuição espacial das interações, do padrão de oviposição e densidade de plantas hospedeiras no campo (Capítulo I); evolução do uso de plantas hospedeiras (Capítulo II) e a relação entre diferenciação genética das populações e a utilização de plantas hospedeiras por diferentes linhagens (Capítulo III). A seleção de plantas hospedeiras por essas espécies apresenta efeito local, onde a densidade das plantas explica um padrão geográfico em mosaico, o que pode refletir na história evolutiva e nas características genéticas populacionais de *Actinote*. Os resultados são discutidos à luz da teoria do mosaico geográfico de coevolução, hipótese da oscilação de recursos e mudanças no uso de plantas hospedeiras ao longo das gerações.

Abstract

This paper investigates some ecological and evolutionary issues on the interactions between a complex of *Actinote* species (Lepidoptera, Nymphalidae) and their host plants. An integrated approach was used at different taxonomic levels, based on the spatial distribution data analysis of interactions. Oviposition pattern and density of host plants in the field (Chapter I); evolution of use of host plants (Chapter II); and relationship between genetic differentiation of populations and the local preference for host plants (Chapter III). The oviposition pattern has a local effect, where the density of the plants is congruent with a geographic mosaic pattern, which may reflect the evolutionary history and population genetic characteristics of *Actinote*. The results are discussed in light of the theory of the geographic mosaic coevolution, hypothesis resources oscillation and changes on the use of host plants throughout the generations.

Introdução

A premissa de que divergência adaptativa pode levar à formação de novas espécies é uma ideia antiga, e move, há mais de um século as discussões de como ocorrem os processos da geração e manutenção da diversidade biológica (Darwin, 1859). Espécies que possuem distribuição ampla podem apresentar diferenças entre suas populações, que podem ser atribuídas não somente ao isolamento geográfico, mas também aos fatores bióticos e abióticos como, por exemplo, interações ecológicas (Thompson, 2005).

A ideia de que especiação simpátrica ocorre com certa frequência na natureza é ainda motivo de muita discussão (Mallet, 2005; Bolnick & Fitzpatrick, 2007; Butlin *et al.*, 2008). A formação de novas espécies a partir de populações que co-ocorrem na mesma área geográfica pode ser interpretada pelas classificações baseadas na estruturação genética populacional (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Sob o contexto espacial, a especiação simpátrica ocorreria em uma escala de distância desde que esta não fosse maior do que a amplitude dos limites genético-populacionais, interpretado pela distância máxima na qual possa ocorrer fluxo gênico direto (Mallet *et al.*, 2009). Dependendo da escala, as interações e os traços morfológicos e genéticos podem variar no tempo ou no espaço, ou em ambos (Freckleton & Jetz, 2009).

Se por um lado divergência espacial pode fazer com que essa distribuição se torne disjunta ao longo do tempo, possibilitando condições alopátricas de diferenciação, por outro a ausência de isolamento pode fazer com que mecanismos ecológicos se tornem mais importantes (Endler, 1977). De maneira geral, a variação geográfica populacional estaria relacionada ao

histórico de ocupação do espaço por uma população ancestral e aos eventos de especiação, representados pelo cenário observado entre características ecológicas da atual distribuição geográfica de uma espécie.

Desta forma, as populações podem ter se diferenciado na seqüência em que ocupavam novos espaços ou, após ocupá-los amplamente e se divergirem, dependendo da conectividade, abundância e distribuição (Rapoport 1975). Dependendo da história biogeográfica de uma determinada espécie, as distâncias geográficas e as barreiras físicas podem limitar a dispersão dos indivíduos, o que pode favorecer divergência fenotípica entre as populações, (Wright, 1943; Slatkin, 1987; Bohonak, 1999). Por outro lado, a seleção natural pode levar à diferenciação entre populações que habitam diferentes ambientes com características ecológicas distintas (Via *et al.* 2000; Nosil, 2004; Nosil *et al.* 2005; Crispo *et al.* 2006).

Insetos herbívoros tem sido alvo de inúmeros estudos em ecologia e genética, bem como na interface dessas disciplinas, com o objetivo de compreender o papel das interações dentro do processo evolutivo. Um quarto da diversidade de espécies pertencem a esse grupo de artrópodes, e essa megadiversidade é resultado, além de outras características, da complexidade na interação com plantas hospedeiras de diferentes famílias (Novotny *et al.*, 2002).

Muitas das hipóteses sobre a evolução de insetos herbívoros estão relacionadas, principalmente, à adaptação e ao uso de plantas hospedeiras (Ehrlich & Raven, 1964; Thompson, 1999; Nuismer & Thompson, 2006; Janz, 2011). A diferenciação populacional e a especiação em insetos herbívoros

podem ser atribuídas à distribuição heterogênea das plantas hospedeiras, tanto espacial como temporalmente (Nyman, 2010).

As borboletas (Lepidoptera), por exemplo, são insetos com grande diversidade, de fácil amostragem e têm sua biologia, ecologia e taxonomia bem conhecidas. A dinâmica de suas populações e as interações com organismos de diferentes grupos taxonômicos, tais como as plantas hospedeiras que utilizam como recursos durante a fase larval, têm papel importante na modelagem da história evolutiva desse insetos (Boggs *et al.* 2003).

Fêmeas dispersantes ou migrantes de uma espécie de borboleta, por exemplo, ao encontrarem novos habitats podem ovipor em plantas hospedeiras diferentes daquelas que tenham sido utilizadas como alimento enquanto larvas (referencia). A mudança na dieta, na medida em que esses novos espaços são ocupados (como por exemplo, dispersão para novos fragmentos, alternância no uso de diferentes taxa de plantas hospedeiras), pode ser uma das possíveis causas que levaram à diferenciação e especiação em lepidópteros (Janz & Nylin, 2008).

As plantas possuem defesas físicas e químicas contra os herbívoros e as consequências, em escala evolutiva, podem ter levado ao desenvolvimento de estruturas e traços fenotípicos em toda a comunidade (Stamp, 2003). As defesas químicas são caracterizadas por diferentes compostos que podem ser sequestrados por larvas de várias espécies de lepidópteros. Os adultos das borboletas, principalmente das subfamílias Pierinae (Pieridae), Biblidinae, Melitaeinae, Danainae, Ithomiinae, das tribos Troidini (Papilionidae), Heliconiini e Acraeini (Nymphalidae) e as mariposas da subfamília Arctiinae (Erebidae) (Lafontaine & Fibiger, 2006; Zahiri *et al.*, 2010) são impalatáveis para

predadores vertebrados e invertebrados, através de síntese “de novo”, durante a alimentação larval, presente nas folhas das plantas hospedeiras. Esses compostos químicos muitas vezes são repassados aos adultos que os repassam aos ovos e, assim atuam na defesa desses estágios de vida do inseto (Brown, 1987; Trigo, 2000; Nishida, 2002).

As plantas têm, portanto, grande importância no desenvolvimento desses insetos, sendo que nelas, as variações fenotípicas podem, ainda, influenciar os níveis tróficos superiores, tais como predadores vertebrados (Müller *et al.*, 2006) e parasitoides que podem atuar como agentes de controle populacional e produzir efeitos na variabilidade e estrutura genética das populações de insetos. Conseqüentemente, espera-se também que características físicas e químicas das plantas influenciem o parasitismo nos lepidópteros.

O sistema de estudo

O gênero *Actinote* Hübner [1819] pertence à tribo Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) e inclui borboletas encontradas exclusivamente na região. Os padrões alares amarelo, alaranjado e vermelho estão presentes em grande parte das 23 espécies do gênero que estão registradas no Brasil, o que as tornam visualmente muito similares. *A. pellenea* Hübner, [1821] é a espécie de distribuição mais ampla e faz parte de um clado polifilético, com morfologia muito similar a outras duas espécies, *A. carycina* (Jordan, 1913) e *A. pyrrha* (Fabricius, 1775). A especiação na tribo Acraeini ocorreu, possivelmente, em

um cenário relacionado ao uso de diferentes plantas hospedeiras ao longo de sua história (Silva-Brandão *et al.*, 2008).

A colonização do continente sul-americano por *Actinote* se deu, possivelmente, pela ocupação por um ancestral comum a todo gênero. Uma das hipóteses que explica a cladogênese e a especiação (ver Silva-Brandão *et al.*, 2008) é a de que as linhagens atuais possuem heranças de traços genéticos de um ancestral comum recente, que flutuariam ao longo de gerações por mecanismos de deriva (Maddison, 1997). Nesse caso, eventos de dispersão deveriam ser frequentes o suficiente para diminuir os efeitos produzidos por processos de seleção local durante a história evolutiva desses insetos.

Por outro lado, condições ecológicas locais como clima, as características da espécie da planta hospedeira, e todas as consequências resultantes das interações tróficas envolvidas, também, podem ter influenciado a história evolutiva desses insetos. Isso porque a distribuição ampla desse gênero de borboleta permite que as espécies ocupem diferentes domínios biogeográficos e climáticos, caracterizados pela heterogeneidade espacial e biológica.

A composição das taxocenoses utilizadas pelas espécies de *Actinote* varia geograficamente e dentre as plantas utilizadas por suas lagartas são encontradas diferentes espécies da família Asteraceae (Francini, 1992). Tais espécies são amplamente encontradas pelo território brasileiro, principalmente as dos gêneros *Austroeupatorium*, *Vernonanthura*, *Chromolaena* e *Mikania* (Tabela 1).

Tabela 1. Registros das 23 espécies de *Actinote* nos Estados brasileiros e suas plantas hospedeiras (Asteraceae). ^aPaluch (2006); ^bBeccaloni *et al.* (2008). ^c **Freitas *et al.* (2009); King & Robinson (1987); The Plant List (2010). Version 1.** <http://www.theplantlist.org/>. (*) **Paluch *et al.*, (2006). (1) *A. pallescens*, segundo Paluch (2006).**

Espécie de <i>Actinote</i>	Distribuição ^a	Plantas hospedeiras ^{a,b,c}
<i>A. alalia</i>	MG, PR, RJ, RS, SC, SP	<i>Chromolaena sp.</i> ; <i>Mikania sp.</i>
<i>A. bonita</i>	MG	<i>Austroeupatorium inulaefolium</i>
<i>A. brylla</i> ¹	MG, RJ, SC, SP	<i>Mikania lundiana</i>
<i>A. canutia</i>	BA, ES, MG, RJ, SP	<i>Mikania micranta</i>
<i>A. carycina</i>	DF, ES, GO, MG, PR, SC, RJ, RS, SP	<i>Austroeupatorium inulaefolium</i> ; <i>Eupatorium sp.</i> ; <i>Chromolaena sp.</i> ; <i>Mikania micrantha</i>
<i>A. catarina</i>	PR, RS	Desconhecida
<i>A. conspicua</i>	MG, RJ, SP	<i>Mikania banisteriae</i>
<i>A. dalmeidai</i>	MG, RJ, RS, SC, SP	<i>Chromolaena sp.</i>
<i>A. discrepans</i>	DF, SC, RJ, RS, SP	<i>Mikania banisteriae</i>
<i>A. eberti</i>	MG, RJ, SP	Desconhecida
<i>A. furtadoi</i> *	MT	Desconhecida
<i>A. genitrix</i>	ES, MG, PR, RJ, RS, SP	<i>Mikania sp.</i>
<i>A. mamita</i>	MG, PR, RJ, RS, SC, SP	<i>Chromolaena sp.</i> ; <i>Erigeron maximus</i> ; <i>Mikania micrantha</i> ; <i>Senecio brasiliensis</i>
<i>A. melanisans</i>	DF, MG, GO, PR, RJ, RS, SP	<i>Mikania micrantha</i> ; <i>M. scandens</i>
<i>A. morio</i>	MG, DF	Desconhecida
<i>A. parapheles</i>	DF, MG, GO, PR, RJ, RS, SP	<i>Chromolaena sp.</i> ; <i>Mikania banisteriae</i> ; <i>M. glomerata</i> ; <i>M. sericea</i> ; <i>M. Scandens</i>
<i>A. pellenea</i>	AC, AM, BA, DF, MG, GO, PB, PE, PR, RJ, RS, SC, SP	<i>Austroeupatorium inulaefolium</i> , <i>Chromolaena odorata</i> , <i>Eupatorium sp.</i> , <i>Mikania banisteriae</i> , <i>M. scandens</i> , <i>M. parviflora</i> , <i>M. micrantha</i> , <i>Senecio brasiliensis</i>
<i>A. pratensis</i>	MG	<i>Chromolaena sp.</i>
<i>A. pyrrha</i>	ES, MG, PR, RJ, RS, SP	<i>Chromolaena sp.</i> , <i>Mikania micrantha</i>
<i>A. quadra</i>	MG, RJ	<i>Ophryosporus regnellii</i>
<i>A. rhodope</i>	DF, ES, MG, PR, RJ, RS, SC, SP	<i>Mikania banisteriae</i> , <i>M. scandens</i> , <i>M. trinervis</i>
<i>A. surima</i>	DF, MG, PR, RJ, RS, SC, SP	<i>Chromolaena sp.</i> , <i>Mikania banisteriae</i> , <i>Senecio brasiliensis</i>
<i>A. zikani</i>	SP	<i>Mikania obsoleta</i>

As plantas hospedeiras são comumente encontradas em bordas de mata, brejos, áreas abertas e matas de galeria (Figura I). Cada fêmea de *Actinote* pode ovipor até 400 ovos em agrupamentos e, geralmente, na mesma espécie de planta (Francini, 1989, 1992; Paluch, 2006). As lagartas desse gênero podem apresentar, entre as espécies, diferenças quanto ao número de instares dependendo da (Paluch et al. 1999, 2001), e são caracterizadas pela presença de coloração que variam entre vermelho, alaranjado e preto, sendo principalmente evidentes nos segmentos torácicos, últimos segmentos abdominais e anal (Figura II; ver revisão de Paluch, 2006 para maiores informações sobre a morfologia das lagartas e quetotaxia).

Esse gênero de borboleta apresenta uma afinidade bioquímica dessas borboletas com as espécies de plantas que utiliza. São impalatáveis, e podem biossintetizar glicosídeos cianogênicos oriundos das folhas, e sintetizar “de novo” de alcalóides pirrozilidínicos em pequenas concentrações durante a fase larval (Francini, 1989, 1992; Brown & Francini 1990; Trigo, 2000).

Atualmente, os estudos taxonômicos sobre o gênero sugerem que algumas raças geográficas, antes consideradas como sendo uma única subespécie de distribuição ampla, possuem características divergentes e de distribuição restrita, sendo assim consideradas em estudos recentes como novas subespécies (Paluch, 2006; Paluch et al., 2006). Por exemplo, a subespécie *A. pellenea pellenea* foi separada em duas subespécies novas: *A. pellenea giffordi* Paluch, Casagrande e Mielke [2006], até o momento registrada apenas na região centro-oeste, e *A. pellenea auloeda* [Oberthür 1917] no nordeste do Brasil. Em tempo, *A. pellenea calymma* foi renomeada como a *A.*

pellenea diaguita, uma nova subespécie restrita ao norte da Argentina (Vale de Jujuy) e na fronteira sul da Bolívia. Em Goiás e no Distrito Federal, devido ao acúmulo de amostras microgeográficas, há estimativas de ocorrência de espécies ainda não descritas (Paluch *et al.*, 2006).

Além disso, populações de *Actinote* apresentam grande variação fenotípica intra-populacional, atribuída às diferenças individuais em relação à coloração e forma das manchas alares (D'Almeida, 1935; Pierre, 1985, 1987; Francini, 1989, 1992). Isso talvez explique as dificuldades em estabelecer limites taxonômicos, não só pelo fato da grande variação morfológica encontrada nas populações, mas também devido ao aumento dos conhecimentos sobre a distribuição das espécies e a utilização de novos caracteres morfológicos de identificação específica.

Contudo, compreender padrões biogeográficos e relacioná-los à história evolutiva de um táxon ou clado requer uma abordagem que incorpore dados sobre a distribuição espacial e ecologia e, ao mesmo tempo, que seja capaz de fazer inferências temporais e evolutivas (Morrone, 2009). Estabelecer uma possível correlação entre características ecológicas e as relações filogenéticas poderiam embasar algumas ideias sobre o papel de fatores bióticos e abióticos na especiação de um determinado grupo. A história evolutiva das borboletas da tribo Ithomiinae (Nymphalidae), por exemplo, mostrou que a convergência ecológica, caracterizada pela ocupação de nicho, está correlacionada com a formação de grupos miméticos, e que as interações ecológicas positivas teriam grande importância na história evolutiva do grupo (Elias *et al.*, 2008).

Neste trabalho, portanto, foi utilizada uma abordagem multifocal em relação às populações de diferentes espécies de *Actinote*. O objetivo geral foi

associar informações da estrutura genética espacial das populações de *Actinote* com o uso e a distribuição das suas plantas hospedeiras, para responder perguntas específicas a respeito da evolução dos padrões de herbivoria no grupo.

Desta forma a tese está estruturada em três capítulos com o seguintes objetivos específicos: (i) determinar os padrões de oviposição de *A. melanisans* (espécie monofága) e de outras três espécies oligófagas, em função da disponibilidade de plantas hospedeiras e da co-ocorrência de ovos e lagartas; (ii) verificar padrões evolutivos (estados monofágos e oligófagos) e biogeográficos da interação das borboletas do gênero *Actinote* e as plantas hospedeiras e (iii) correlacionar estruturação genética e uso de plantas hospedeiras por diferentes populações de *Actinote pyrrha*.

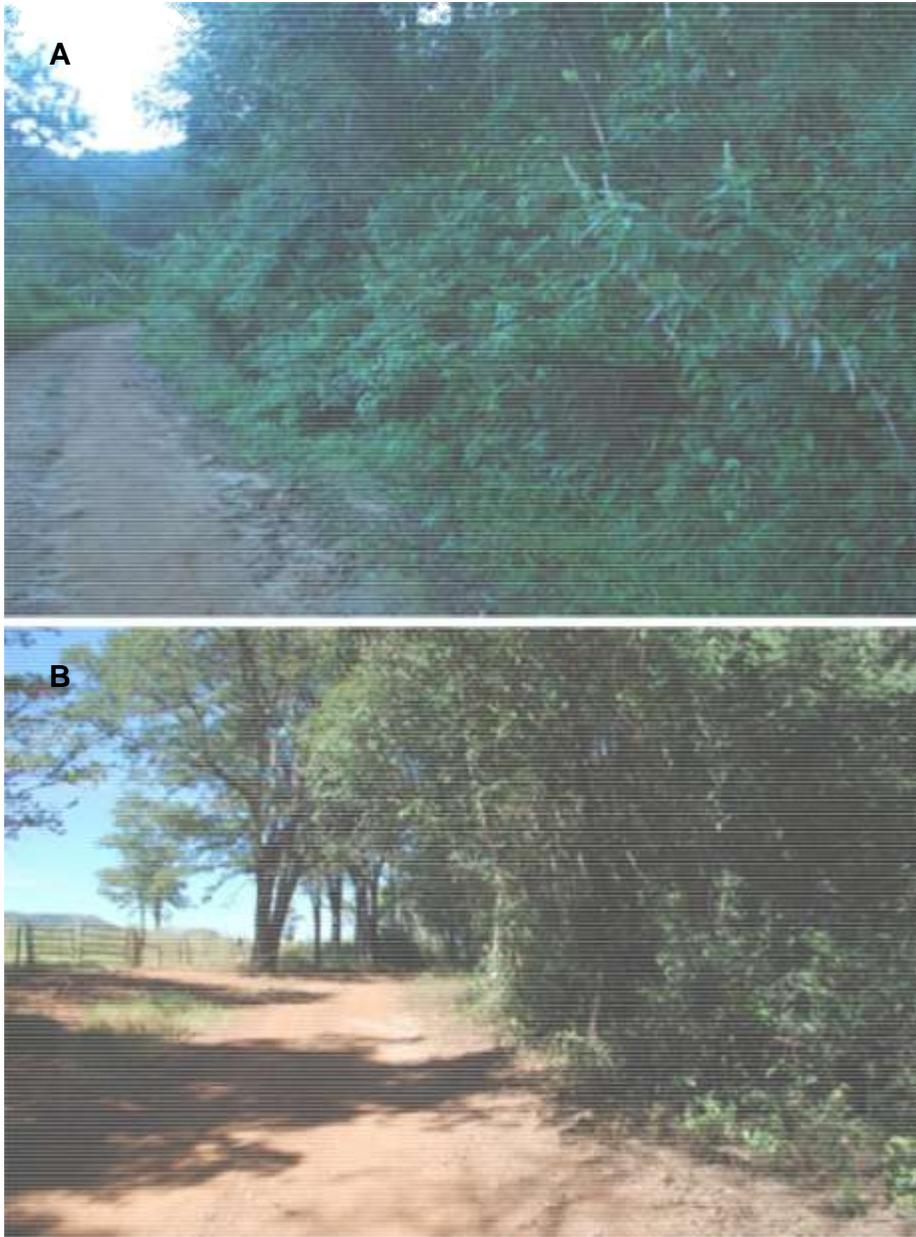


Figura I. Visão geral do habitat onde comumente são encontradas plantas hospedeiras de *Actinote*. (A) em bordas de fragmentos de mata atlântica (Ubatuba, litoral de São Paulo); (B) em bordas de matas de galeria, no Cerrado do Estado de Goiás e do Distrito Federal.

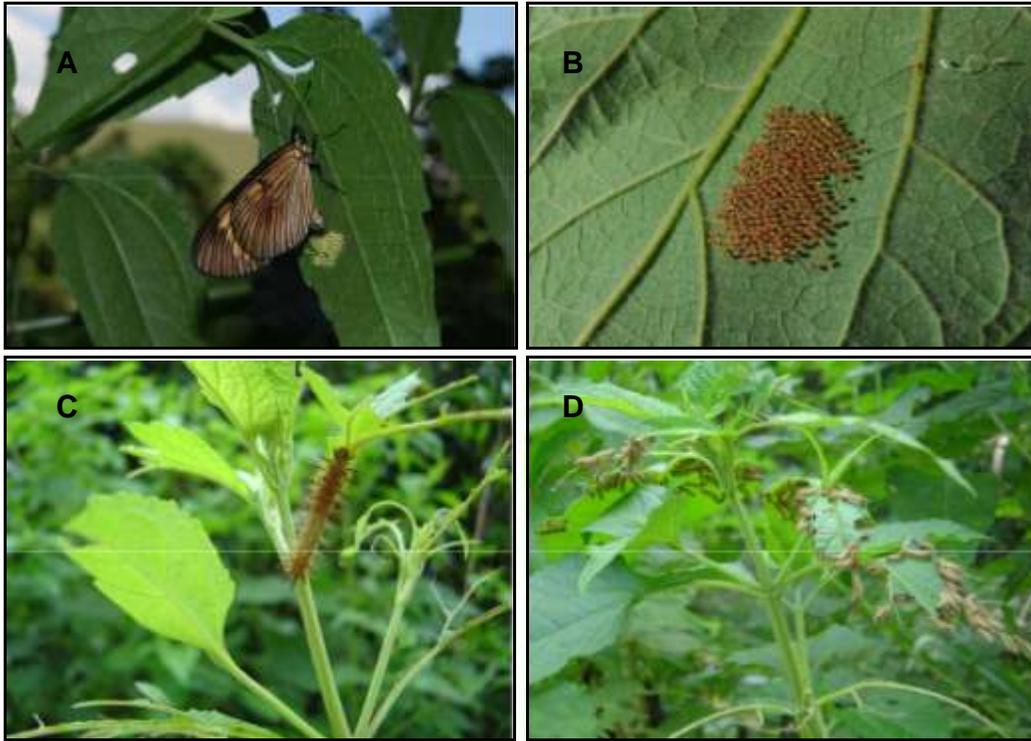


Figura II. Fotos de diferentes estágios de desenvolvimento característicos de *Actinote*. (A) fêmea de *Actinote pyrrrha* ovipondo na face abaxial de uma folha de *Chromolaena odorata*; (B) grupo de ovos de *Actinote pellenea* na face abaxial de uma folha de *Austroeupatorium inulaefolium*; (C) lagarta de sexto instar de *Actinote pellenea* em *Austroeupatorium inulaefolium*; (D) agrupamento de lagartas de quarto instar de *Actinote pellenea* em *Austroeupatorium inulaefolium*.

Referências

- Beccaloni, G.W., Vilorio, A.L., Hall, S.K. & Robinson, G.S. (2008). Catalogue of the host-plants of the Neotropical butterflies. In: **Monografias Tercer Milenio vol. 08**. The Natural History Museum, London. p. 224-229
- Boggs, C. L., Watt, W. B., & Ehrlich, P. R. (2003). **Butterflies: ecology and evolution taking flight**. University of Chicago Press
- Bohonak, A. 1999. Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. **The Quarterly Review of Biology**, Vol. 74(1): 21-45.
- Bolnick, D. I. & Fitzpatrick, B. M. (2007). Sympatric speciation: models and empirical evidence. **Annual Review Ecology Evolution and Systematics** 38: 459–487.
- Brown Jr, K. S. (1987). Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae interface. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 359-397.
- Brown Jr., K.S. & Francini, R.B. (1990). Evolutionary strategies of chemical defense in aposematic butterflies: cyanogenesis in Asteraceae-feeding American Acraeinae. **Chemoecology**, 1(2): 52-56.
- Butlin, R. K., Galindo, J. & Grahame, J. W. (2008). Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? **Philosophical Transactions Royal Society London B, Biological Sciences**, 363: 2997–3007
- D'Almeida, R.F. (1935). Les *Actinote* de la partie orientale de l'Amérique du Sud. **Annaes da Academia Brasileira de Ciências**, 7: 69-112.
- Crispo, E., Bentzen, P., Reznik, D., Hendry, A. 2006. The relative influence of natural selection and geography on gene flow in guppies. **Molecular Ecology** 15: 49–62.
- Darwin, C. (1859). **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life**. London. (J. Murray).
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18 (4): 586-608.
- Elias, M., Gompert, Z., Jiggins, C. & Willmott, K. (2008). Mutualistic I-interactions drive ecological niche convergence in a diverse butterfly community. **PLoS Biology**, 6(12): e300. doi:10.1371/journal.pbio.0060300.
- Endler, J. A. **Geographic variation, speciation, and clines**. Princeton: Princeton University Press, 1977. 246 p.
- Fitzpatrick, B.M., Fordyce, J.A. & Gavrillets, S. (2008). What, if anything, is sympatric speciation? **Journal Evolutionary Biology**, 21: 1452–1459.
- Francini, R.B. (1989). **Biologia e ecologia das borboletas *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae) na transição subtropical no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Francini, R.B. (1992). **Ecologia de taxocenoses de *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae) em Asteraceae (Angiosperma: Magnoliatae) no Sudeste do Brasil: subsídios para conservação**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

- Freckleton, R. P. & Jetz, W. (2009). Space versus phylogeny: disentangling phylogenetic and spatial signals in comparative data. **Proceedings. Royal Society B**, 276: 21730.
- Janz, N. (2011). Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. **Annual Review Ecology Evolution Systematic**, 42: 71–89.
- Janz, N. & Nylin, S. (2008). The oscillation hypothesis of host-plant range and speciation. In: Tilmon, K.J. (Ed.). **Specialization, speciation and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects**. University of California Press, Berkeley. p. 203-215.
- Lafontaine, J.D. & Fibiger, M. (2006). Revised higher classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **Canadian Entomology**, 138: 610–635.
- Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, 46(3): 523-536.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. **Trends Ecology Evolution**, 20:229–237.
- Mallet, J., Meyer, A., Nosil, P., & Feder, J. L. (2009). Space, sympatry and speciation. **Journal of evolutionary biology**, 22(11), 2332-2341.
- Müller, M., McWilliams, S., Podlesak, D., Donaldson, J.R., Bothwell, H. & Lindroth, R. (2006). Tri-trophic effects of plant defenses: chickadees consume caterpillars based on host leaf chemistry. **Oikos**, 114: 507-517.
- Nishida, R. (2002). Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual review of entomology**, 47(1), 57-92.
- Nosil, P. (2004). Reproductive isolation caused by visual predation against migrants between divergent environments. **Proceedings Royal Society London B**, 271: 1521–1528.
- Nosil, P., Vines, T.H. & Funk, D.J. (2005). Perspective: reproductive isolation driven by natural selection against migrants between divergent environments. **Evolution**, 59: 705-709.
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S. E., Weiblen, G. D., Bremer, B., Cizek, L., & Drozd, P. (2002). Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. **Nature**, 416(6883), 841-844.
- Nuismer, S. L., & Thompson, J. N. (2006). Coevolutionary alternation in antagonistic interactions. **Evolution**, 60(11), 2207-2217.
- Nyman, T. (2010). To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant-feeding insects. **Biological Reviews**, 85(2): 393-411.
- Paluch, M., Casagrande, M. M., & Mielke, O. H. (1999). Immature stages of *Actinote surima* (Schaus)(Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 16: 129-140.
- Paluch, M., Casagrande, M. M., & Mielke, O. H. (2001). Estágios imaturos de *Actinote carycina* Jordan (Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 18(3): 883-896.
- Paluch, M. (2006). Revisão das espécies de *Actinote* Hübner, [1819] (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae, Acraeini). **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- Paluch, M., Casagrande, M.M. & Mielke, O.H.H. (2006). Três espécies e duas subespécies novas de *Actinote* Hübner (Nymphalidae, Heliconiinae, Acraeini). **Revista Brasileira de Zoologia**, 23: 764–778.
- Pierre, J. (1985). Morphologie compare de l'appareil genital male des Acraeinae (Lepidoptera, Nymphalidae). **Annales Société Entomologique France**, 21(4): 381-391.
- Pierre, J. (1987). Systematique cladistique chez les *Acraea* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Annales Société Entomologique France**, 23(1): 11-27.
- Rapoport, E. (1975) **Areografía: estrategias geográficas de las especies**. México, DF: Fondo de Cultura Económica. 214 p.
- Silva-Brandão, K.L., Wahlberg, N., Francini, R.B., Azeredo-Espin, A.M.L., Brown Jr., K.S., Paluch, M., Lees, D.C. & Freitas, A.V.L. (2008). Phylogenetic relationships of butterflies of the tribe Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) and the evolution of host plant use. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 46: 515–531.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations **Science** 236 (4803): 787-792.
- Stamp, N. (2003). Out of the quagmire of plant defense hypotheses. **The Quarterly Review of Biology**, 78 (1): 23-55.
- Thompson, J.N. (1999). Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. **The American Naturalist**, 153: 1-14.
- Thompson, J. N. (2005). **The geographic mosaic of coevolution**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Trigo, J.R. (2000). The Chemistry of antipredator defense by secondary compounds in Neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, 11 (6): 551-561.
- Via, S., Bouck, A. C., & Skillman, S. (2000). Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. **Evolution**, 54(5), 1626-1637.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics**, 28: 114-38.
- Zahiri, R., Kitching, I.J. Lafontaine, J.D. Mutanen, M. Kaila, L. Holloway, J.D. & Wahlberg, N. (2010). A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **Zoology Scripta**, 40: 158-173.

Capítulo 1. Padrão de oviposição e evolução da oligofagia em um complexo de espécies do gênero *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae)

Introdução

A interação e mudanças no uso de plantas hospedeiras têm sido apontados como alguns dos principais fatores responsáveis pela grande diversificação encontrada em insetos herbívoros (Ehrlich & Raven, 1964; Mitter *et al.*, 1988, 1991; Farrell, 1998; Farrell & Sequeira, 2004; Janz *et al.*, 2006; Winkler & Mitter, 2008; Menken *et al.*, 2009; Bennett & O'Grady, 2013). A distribuição heterogênea das plantas, e a variação espacial e temporal na disponibilidade e qualidade de recursos pode resultar em uso diferencial de espécies de plantas, o que poderia levar tanto à especialização como ao aparecimento de generalistas (Thompson, 2005).

Devido à variação geográfica de características químicas das plantas, e comportamentais e ecológicas dos insetos, é possível que algumas populações ou linhagens apresentem plasticidade no uso de recurso ou diferentes níveis de especificidade (Ehrlich & Raven, 1964; Thompson, 1999; Janz, 2011). Nesse caso, especialização seria um atributo flexível de uma população que estaria respondendo às características da comunidade em particular (Fox & Morrow, 1981). A regularidade com que as interações ecológicas ocorrem são variáveis e, assim, algumas populações podem estar envolvidas enquanto outras não, em uma interação particular na presença de um herbívoro chave (Foordyce, 2006)

Padrões de oviposição em insetos herbívoros são influenciados por diferentes variáveis, entre elas a distância filogenética, a composição química, a qualidade e disponibilidade das plantas hospedeiras. O uso de planta hospedeira pode ser influenciado tanto por efeitos diretos da abundância local, como por indiretos medidos pela adaptação em nível metapopulacional da espécie da planta mais abundante regionalmente (Kuussaari *et al.*, 2000).

Por outro lado, diferenças na amplitude de dieta podem evoluir em um grupo de espécies próximas filogeneticamente, pela combinação de conservatismo na hierarquia de preferência nas populações e pela disponibilidade de hospedeiras (Thompson, 1998). Evolutivamente, a transição de um estado monófago para oligófago, ou vice-versa, estaria diretamente relacionada à estrutura ecológica e da história de vida das populações. Mudanças evolutivas podem ser muito dinâmicas ecologicamente, com ocorrência rápida ao longo de gerações ou de maneira contínua moldando populações e comunidades, localmente e em ampla escala geográfica (Thompson, 2008).

Os padrões de oviposição podem variar em escala local, onde há heterogeneidade na composição e estrutura da assembléia de plantas hospedeiras. Esses padrões podem ser influenciados pela composição de espécies de borboletas e nas interações ecológicas dentro da comunidade, com consequências evolutivas.

O possível papel das plantas hospedeiras na evolução e especiação de borboletas da tribo Acraeini foi discutido por Silva-Brandão *et al.* (2008). A especialização em Asteraceae pode ter tido grande efeito na diversificação e história evolutiva do gênero, e se alia ao fato das espécies estarem distribuídas

amplamente no continente sul-americano em ambientes onde as espécies de Asteraceae apresentam heterogeneidade espacial.

Neste trabalho foi estudado um complexo de espécies do gênero *Actinote* que são especializadas no uso de plantas da família Asteraceae, mas que apresentam, ao mesmo tempo, diferenças na amplitude de espécies de plantas utilizadas na dieta. *A. melanisans* é uma das espécies monófagas do gênero e ovipõe apenas em espécies de *Mikania*. A espécie é o ancestral comum de um clado recente, formado por outras três, *A. pyrrha*, *A. pellenea*, e *A. carycina*, que são oligófagas e podem ovipor em outros gêneros de plantas da mesma família, além de *Mikania* (Francini, 1989, 1992).

O objetivo foi verificar se a estruturação geográfica da distribuição de plantas hospedeiras e a interação interespecífica associada às características de diferentes comunidades podem influenciar os padrões de oviposição de *A. melanisans*, *A. pellenea*, *A. carycina*, e *A. pyrrha*. Conforme o “pool” de espécies competidoras diminui, uma espécie em questão pode adquirir maior frequência de ocorrência em espaços ou nichos vagos (Diamond, 1982).

Considerando que a escolha de uma planta não é aleatória, a hipótese é de que a co-ocorrência dessas espécies de *Actinote* e o uso diferencial de plantas hospedeiras, associado a sua disponibilidade e distribuição formam um mosaico geográfico de interações. Tais consequências poderiam ter relação com a transição de um estado monófago para um oligófago, reforçando a relação entre ecologia e diversificação taxonômica.

Metodologia

Foram amostrados doze sítios, numa amplitude geográfica de aproximadamente 500 km, entre o litoral norte de São Paulo e o sul do Rio de Janeiro, na Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e região da Serra da Canastra (Figura 1.1). A amostragem foi feita ao longo de transectos, considerando a área na qual foram realizadas as coletas como sendo a relação entre a distancia percorrida e dois metros adentro da borda de mata onde foram encontradas as plantas (ver Anexo 1.1 para maiores informações sobre as características de cada sítio). A precipitação média e a temperatura anual média foram obtidas em bancos de dados (IBGE, INMET, CEPETEC-INPE). Indivíduos de plantas de quatro gêneros de Asteraceae (*Austroeupatorium*, *Chromolaena*, *Mikania* e *Vernonanthura*), foram vistoriados e contados. Quatro espécies de *Actinote* foram consideradas nesse estudo: o complexo de espécies oligófagas composto por *A. carycina*, *A. pellenea* e *A. pyrrrha*, e o ancestral espécie basal monófaga *A. melanisans*. Grupos de ovos e larvas foram contados no campo, coletados e levados ao laboratório. Os ovos foram acompanhados até a eclosão e as larvas criadas em sacos plásticos, e alimentadas com folhas das mesmas espécies de plantas nas quais foram encontradas no campo.

Análises dos dados

Em cada sítio foi estimada a densidade de plantas de cada um dos quatro gêneros, através da relação entre o número de plantas e área amostrada. Para determinar as diferenças entre as unidades amostrais foi feita uma análise de variância (ANOVA) das medidas de temperatura e precipitação

média anual, da densidade de plantas e do número de grupos de ovos e lagartas. A discriminação das espécies quanto ao uso de plantas hospedeiras (o número de ovos ou lagartas de cada uma das espécies de *Actinote* encontrados em cada gênero de planta), e a distribuição de plantas quanto aos fatores ambientais foram feitas no programa R pela análise discriminatória de redundância (RDA), usando o pacote “vegan” (Oksanen *et al.*, 2013).

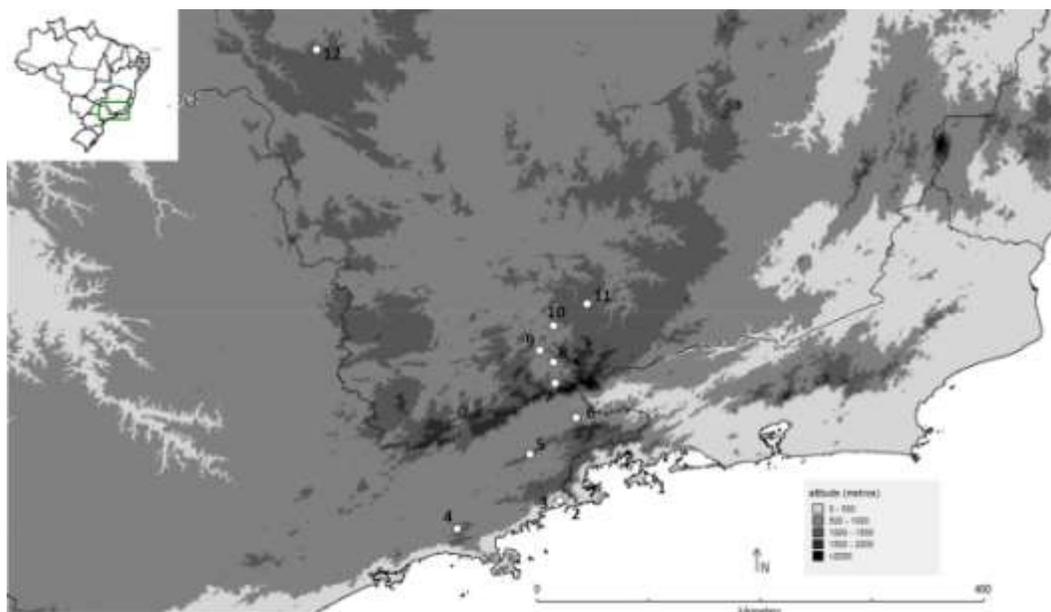


Figura 1.1. Mapa representando a localização dos sítios de coletas. Os gráficos representam a proporção dos quatro gêneros de plantas utilizados no estudo. Os números indicam os sítios amostrados, respectivamente: (1) Ilha Grande, (2) Ubatumirim, (3) Puruba, (4) Salesópolis, (5) Goiabal, (6) Silveiras, (7) Passa Quatro, (8) Pouso Alto, (9) São Lourenço, (10) Caxambu, (11) Cruzília e (12) Araxá.

O padrão de oviposição das quatro espécies foi determinado pela análise de modelo linear misto generalizado (GLMM). Foi considerado para cada espécie o número de grupos de ovos ou larvas por planta hospedeira como variável fixa. As análises foram feitas com 1.000 replicações de “bootstrap”, utilizando o pacote “lme4” (Bates *et al.*, 2014). Com a finalidade de

verificar o efeito local no padrão de oviposição a variável “sitio” foi incluída nos modelos como variável aleatória. Os modelos foram construídos de duas maneiras distintas: (i) considerando o efeito das variáveis ambientais (temperatura, precipitação e altitude) e a densidade de plantas sobre o número de grupos de ovos ou lagartas encontrado em cada espécie, (ii) e o efeito sobre o número de oviposição de uma espécie em detrimento das demais.

Resultados

Foram vistoriadas e contadas nos doze sítios 782 plantas sendo coletadas 134 oviposições ou grupos de lagartas de *Actinote* (Figura 1.2). A densidade de *Austroeupatorium* e *Vernonanthura* e as características ambientais variaram significativamente entre os sítios (Tabela 1.1). A estrutura das comunidades de plantas tem correlação variável com as características ambientais de cada sítio, sendo a altitude um fator de estruturação na distribuição dessas plantas (Figura 1.3B). Essa diferença pode ser observada, principalmente, entre *Austroeupatorium* e *Chromolaena*, e esse resultado pode ter grande importância, já que ambas funcionam como plantas alternativas muito utilizadas por *A. pellenea* e *A. pyrrha*, respectivamente.

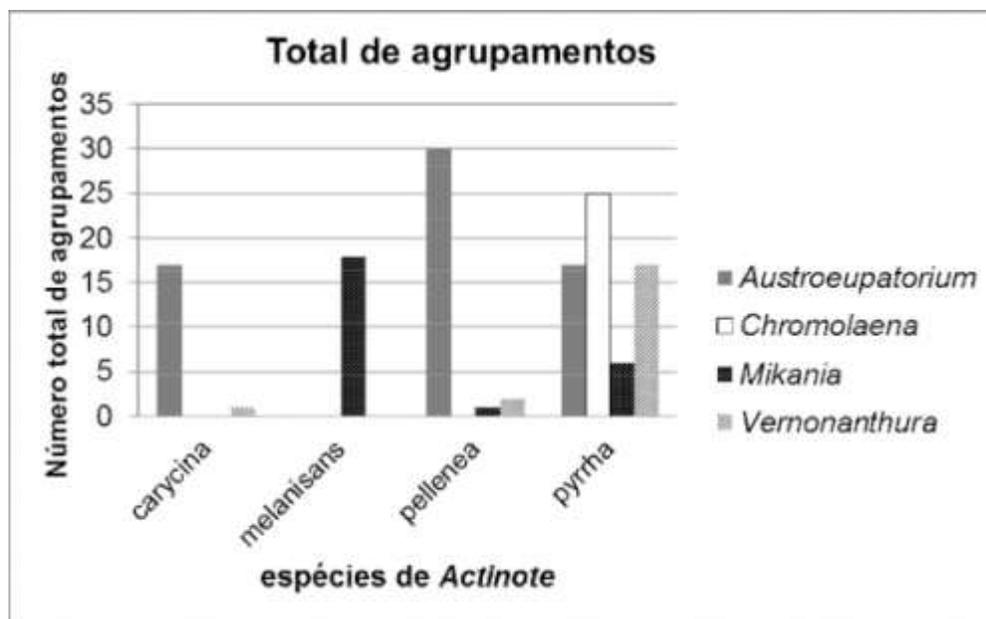


Figura 1.2. Número total de agrupamentos de ovos ou lagartas de *A. melanisans*, *A. pellenea*, *A. carycina*, e *A. pyrrha*, a partir de dados agrupados de coletas realizadas em maio, outubro e dezembro de 2013, nos 12 sítios amostrados.

Tabela 1.1. Resultados da análise de variância das medidas das características ambientais nos 12 sítios amostrados. Os valores significativos ($p < 0,05$) indicam quais as variáveis nas comunidades são importantes para demonstrar a heterogeneidade entre os sítios.

Variável	F	p
Área do transecto	54,9225	$p < 0,01$
Altitude	9,507885E+16	$p < 0,01$
Temperatura	2,771446E+15	$p < 0,01$
Precipitação	3,602880E+15	$p < 0,01$
Densidade das plantas hospedeiras		
<i>Austroeuatorium</i>	26,3424	$p < 0,01$
<i>Chromolaena</i>	1,10766	0,4342
<i>Mikania</i>	0,91439	0,5577
<i>Vernonanthura</i>	4,13127	$p < 0,01$

A densidade de *Austroeuatorium* tem efeito positivo e significativo no padrão de oviposição de *A. pellenea* e *A. carycina*. Da mesma forma a probabilidade de se encontrar ovos de *A. melanisans* é dependente da densidade de indivíduos do gênero *Mikania*. O padrão de oviposição é influenciado pela densidade de *Austroeuatorium* e *Vernonanthura* e a densidade de *Chromolaena*, afeta a abundância de grupos de lagartas de *A. pyrrha* (Tabela 1.2). O gênero *Chromolaena* é utilizado exclusivamente por *A. pyrrha*, o que, além da altitude, é um fator discriminante no padrão de oviposição desta espécie (Figura 1.3A).

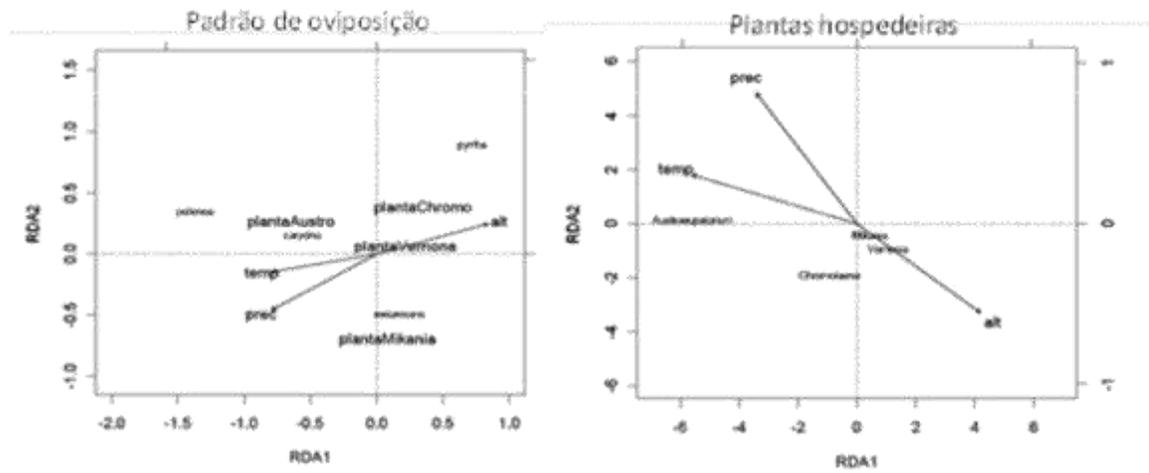


Figura 1.3. Resultados das análises discriminantes de redundância. (A) espécies de *Actinote* em função do número de grupos de ovos ou lagartas encontradas em cada gênero de planta hospedeira e as variáveis ambientais (alt: altitude; prec: precipitação anual média; temp: temperatura). (B) correlação entre variáveis ambientais e densidade de cada gênero de plantas em cada sítio.

Tabela 1.2. Resumo dos resultados da análise de modelos mistos generalizados. Número de oviposição encontrado para cada uma das espécies de *Actinote*, em função do gênero e da densidade da planta (fator fixo), em cada sítio (fator aleatório). (Std. Error) erro padrão. São apresentados apenas os resultados significativos. Ver Anexo 1.5 para visualizar os resultados completos da análise.

	Estimate	Std.Error	z value	Pr(> z)
<i>A. melanisans</i>				
(Intercept)	-2.372e+00	5.699e-01	-4.162	3.16e-05
plantaMikania:dens	7.155e+01	1.858e+01	3.850	0.000118
<i>A. carycina</i>				
(Intercept)	-2.022e+00	4.521e-01	-4.473	7.70e-06
plantaAustro:dens	2.591e+01	5.852e+00	4.427	9.56e-06
<i>A. pellenea</i>				
(Intercept)	-2.956e+00	8.803e-01	-3.357	0.000787
plantaAustro:dens	4.586e+01	1.088e+01	4.216	2.49e-05
<i>A. pyrrha</i>				
(Intercept)	-1.1731	0.3527	-3.326	0.000881
plantaAustro:dens	13.4968	6.6742	2.022	0.043151
plantaChromo:dens	44.7631	10.2687	4.359	1.31e-05
plantaVernona:dens	28.1375	8.8454	3.181	0.001468

Os resultados dão suporte para uma significativa co-ocorrência de ovos e lagartas de *A. pellenea* e *A. carycina* no mesmo sítio. A presença de lagartas dessas duas espécies possui efeito positivo mútuo e significativo. Porém esse efeito não foi observado na mesma planta localmente (Anexo 1.6). O efeito da presença de oviposição dessas duas espécies na mesma planta e localidade é negativo, porém não foi significativo.

Esse padrão se repete nas relações entre o número de ovos ou lagartas de diferentes espécies de borboletas na mesma localidade. Em todas as espécies de *Actinote*, o efeito sobre a presença de ovos ou lagartas de uma espécie não é significativo em detrimento da presença de outras.

A comparação entre os valores de z permite medir a distribuição das variâncias e o quanto há de desvio acima ou abaixo da média. Os valores de z utilizados foram aqueles onde os modelos obtiveram menor valor do critério de informação bayesiana (BIC). Os resultados dos modelos em cada espécie mostram que as espécies respondem diferentemente aos efeitos interespecíficos no mesmo sítio e no mesmo gênero de planta (Figura 1.4).

Em *A. melanisans*, os valores de z ficaram próximos da média (se comparados com os valores encontrados em *A. pyrtha*), quando se encontrou oviposição de outras espécies em *Mikania*. *A. carycina* apresentou variação no número de grupos de ovos e lagartas abaixo da média quando há outras espécies ovipondo em *Mikania*.

Já o número de grupos de ovos e lagartas em *A. pellenea* varia muito pouco ou se manteve em torno da média quando há oviposição de outras espécies na mesma planta e sítio. As variâncias podem estar acima da média

quando comparados os padrões de oviposição de *A. carycina*. Padrão similar é encontrado em *A. pyrrha*

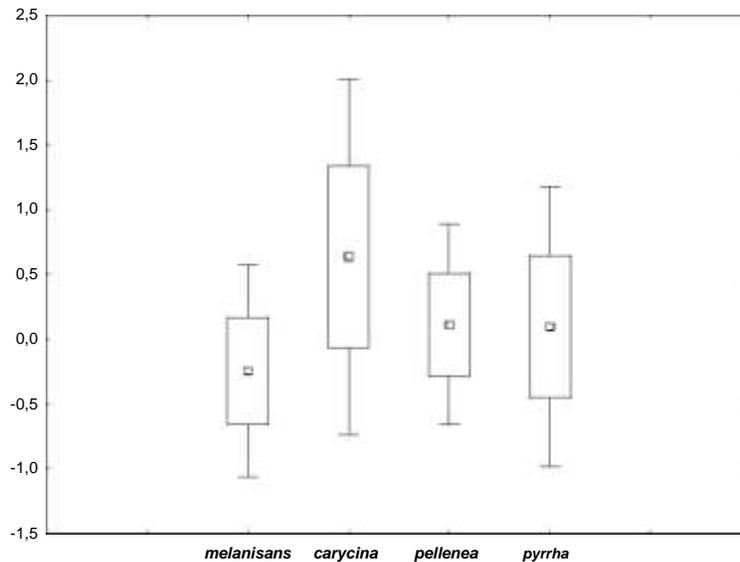


Figura 1.4. Box plots dos valores de Z resultantes das análises de modelos lineares generalizados mistos para o padrão de oviposição de uma espécie e o efeito interespecífico de grupos de ovos ou lagartas nas quatro plantas hospedeiras estudadas (Anexo 1.6) mostrando maior variância em *A. melanisans* e *A. pellenea*. Os valores de Z utilizados foram aqueles onde foram observados menores valores do critério de informação bayesiana. As diferenças quando foram comparados pela ANOVA Friedman e pelo coeficiente de correlação de Kendal ($p > 0,05$).

Discussão

Foi mostrado que tanto a espécie monófaga quanto as oligófagas podem coexistir e ovipor em plantas do mesmo gênero, ou no mesmo sítio, porém o efeito interespecífico de grupos de ovos ou lagartas de diferentes espécies na mesma planta e no mesmo sítio não foi significativo. *A. melanisans* é monófaga e provavelmente menos susceptível aos efeitos da presença de outras espécies no mesmo sítio. As espécies especialistas podem apresentar melhor desempenho em relação as generalistas quando utilizam a mesma planta.

Por outro lado, o padrão observado nas espécies oligófagas pode ter relação com a presença de plantas alternativas, o que permitiria evitar qualquer tipo de sobreposição de uso de recursos localmente. Padrões similares foram encontrados em *A. pellenea* e *A. carycina* e mostram uma grande sobreposição ecológica na escolha da planta hospedeira. A similaridade ecológica e genética dessas espécies já é bastante conhecida (Francini, 1989, 1992, Silva-Brandão *et al.*, 2008). São comumente encontradas juntas e compartilhando os mesmos tipos de recursos. Imaturos das duas espécies podem ser encontrados no mesmo sítio, porém nunca na mesma planta. Utilizam os mesmos recursos, porém quando estão juntas, é possível que ambas escolham plantas diferentes, devido a diferenças eco fisiológicas, como por exemplo a existência de períodos de diapausa encontrados em *A. carycina* (R.B. Francini, comunicação pessoal).

A. pyrrha parece apresentar um comportamento oportunista, e pode estar relacionado com a disponibilidade de plantas hospedeiras. Por exemplo, essa espécie foi a única a ser encontrada em folhas de *Chromolaena*. Esse gênero de planta hospedeira pode ter sido incorporada à dieta dessa borboleta, e que recentemente passou a utilizá-la como fonte alternativa de recurso. Talvez, por esse motivo, encontrar grupos de ovos ou lagartas das demais espécies talvez não influencie o padrão geral de oviposição em *A. pyrrha*.

Disponibilidade de plantas parece ser mais importante em casos de mudança para uma nova planta do que a presença de ovos e lagartas de outras espécies. *Austroeupatorium* e *Vernonathura* também apresentam diferenças quanto à densidade de indivíduos, cuja distribuição pode ser tanto homogênea (dispersas ao longo do transecto) como agrupada (em manchas)

dentro dos sítios e são utilizadas por todas as espécies oligófagas, principalmente, quando essas plantas ocorrem em alta densidade.

Apesar dos efeitos interespecíficos da presença de imaturos de diferentes espécies de *Actinote* não serem significativos, o aumento da oferta e a disponibilidade de novos recursos podem exercer grande influência nos padrões de oviposição, sendo também um componente importante na evolução dessas espécies, na transição entre um estado monófago para um comportamento oligófago.

Os padrões de oviposição das quatro espécies de *Actinote* apresentam forte componente geográfico. Diferentes populações de insetos herbívoros não apresentam diferenças no desempenho ao utilizarem plantas alternativas, provavelmente porque a variação na disponibilidade de hospedeiras poderia levar a diferenças de adaptação local (Stotz *et al.*, 2013).

Apesar do desempenho do imaturo ser importante na seleção de planta hospedeira (Videla *et al.*, 2012), e ter grande influência na tomada de decisão sobre qual planta a fêmea irá ovipor, tal fator não pode ser considerado como única explicação (Janz *et al.*, 2009). A escolha pelo recurso pode não ter valor adaptativo, e talvez o desempenho do adulto em termos de comportamento e regras de decisão seja tão importante quanto o desempenho do imaturo (Mayhew, 2001). O comportamento do adulto pode ter maior relação com a evolução da amplitude da dieta e com mudanças no uso de plantas hospedeiras ao longo de gerações, do que o desempenho do imaturo (Forister *et al.*, 2009).

As fêmeas das espécies de *Actinote* depositam nas folhas agregados com centenas de ovos. *A. pellenea*, por exemplo, pode depositar agregados de ovos em indivíduos de *Austroeupatorium inulaefolium* que já tenham imaturos presentes (Francini & Freitas, 2010). Já as populações de *A. pyrrha* podem ser muito maiores, e um grande número de agregados de ovos desta espécie podem ser encontrados na maior parte das plantas utilizadas na sua dieta. Talvez, como em outros grupos de insetos herbívoros, as fêmeas apresentem um comportamento onde seleções piores por plantas hospedeiras são feitas, de modo que seja garantido um melhor desempenho a longo prazo, em detrimento do desempenho individual (Scheirs *et al.*, 2000; Mayhew, 2001).

Para se compreender melhor a ecologia e sua relação com diversificação taxonômica, é necessário reformular o conceito de oportunidade ecológica (Hardy & Otto, 2014). As características comportamentais das fêmeas de *Actinote* e os padrões encontrados neste trabalho indicam que os padrões de oviposição observados são consequências da complexidade de interação e de atributos ecológicos em escala local, principalmente relacionado a abundância de plantas hospedeiras. As espécies recentes oligófagas de *Actinote* podem, a princípio, apresentar padrões característicos de espécies oportunistas. Esse trabalho abre a possibilidade de se relacionar a disponibilidade de plantas e interações ecológicas a possíveis regras de decisões tomadas pelas fêmeas como critérios para ovipor em uma determinada planta. Nesse contexto, a condição de oportunista pode ser melhor investigada, com a finalidade de se estudar a evolução da especialização em insetos herbívoros e a ecologia dos padrões de oviposição.

Referências

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H. & Rcpp, L. (2014). Package 'lme4'. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna.**
- Bennett, GM, O'Grady, PM (2013) Historical biogeography and ecological opportunity in the adaptive radiation of native Hawaiian leafhoppers (Cicadellidae: Nesophrosyne). **Journal Biogeography**, 40:1512–1523. doi: 10.1111/jbi.12099
- Diamond, J. (1982). Effect of species pool size on species occurrence frequencies: musical chairs on islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 79(7): 2420-2424.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18 (4): 586-608.
- Farrell, BD (1998) 'Inordinate fondness' explained: why are there so many beetles? **Science**, 281:555–559.
- Farrell, B.D. & Sequeira, AS (2004). Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. **Evolution**, 58:1984-2001.
- Fordyce, J.A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. **Journal of Experimental Biology**, 209: 2377-2383.
- Forister, M. L., Nice, C. C., Fordyce, J. A. & Gompert, Z. (2009). Host range evolution is not driven by the optimization of larval performance: the case of *Lycaeides melissa* (Lepidoptera: Lycaenidae) and the colonization of alfalfa. **Oecologia**, 160(3): 551-561.
- Fox, L. R. & Morrow, P. A. (1981). Specialization: species property or local phenomenon? **Science**, 211: 887-893.
- Francini, R.B. (1989). Biologia e ecologia das borboletas *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae) na transição subtropical no sudeste do Brasil. **Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, Brasil.
- Francini, R.B. (1992). Ecologia de taxocenoses de *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae) em Asteraceae (Angiosperma: Magnoliatae) no Sudeste do Brasil: subsídios para

- conservação. **Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, Brasil.
- Francini, R. B. & Freitas, A. V. L. (2010) Aggregated oviposition in *Actinote pellenea pellenea* Hubner (Lepidoptera: Nymphalidae). **Journal of Research on Lepidoptera**. **42**, 74–78.
- Hardy, N.B & Otto, S.P. (2014). Specialization and generalization in the diversification of phytophagous insects: tests of the musical chairs and oscillation hypotheses. **Proceedings Royal Society London B**, 281:2013-2960.
- Janz, N. (2011) “Ehrlich and Raven Revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**. **42** (1): 71–89.
- Janz, N., Söderlind, L. & Nylin, S. (2009). No effect of larval experience on adult host preferences in *Polygonia c-album* (Lepidoptera: Nymphalidae): on the persistence of Hopkins' host selection principle. **Ecological Entomology**, **34**(1): 50-57.
- Janz, S. Nylin, S. & Wahlberg, N. (2006) Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. **BMC Evolutionary Biology**, **6** (1): 4.
- Kuussaari, M., Singer, M. & Hanski, I. (2000). Local specialization and landscape-level influence on host use in an herbivorous insect. **Ecology**, **81**(8): 2177-2187.
- Mayhew, P. J. (2001). Herbivore host choice and optimal bad motherhood. **Trends in Ecology & Evolution**, **16**(4): 165-167.
- Menken SBJ, Boomsma JJ, van Nieukerken EJ (2010) Large-scale evolutionary patterns of host plant associations in the lepidoptera. **Evolution** (N Y) **64**:1098–1119. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00889.x
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B. & Imports, M. A. S. S. (2013). Package ‘vegan’. **Community ecology package**, version, 2(9).
- Scheirs, J., De Bruyn, L., & Verhagen, R. (2000). Optimization of adult performance determines host choice in a grass miner. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, **267**(1457): 2065-2069.

- Silva-Brandão, K.L., Wahlberg, N., Francini, R.B., Azeredo-Espin, A.M.L., Brown Jr., K.S., Paluch, M., Lees, D.C. & Freitas, A.V.L. (2008). Phylogenetic relationships of butterflies of the tribe Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) and the evolution of host plant use. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 46: 515–531.
- Stotz G.C., L. H. Suárez, W. L. Gonzáles & Gianoli, E. (2013). Local host adaptation and use of a novel host in the seed beetle *Megacerus eulophus*, **PLoS One**, 8 (10): 1–5.
- Thompson, J. N. (1998). Rapid evolution as an ecological process. **Trends in Ecology and Evolution**, 13(8): 329-332
- Thompson J. N. (1999). Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. **American Naturalist**. 153 (S5):S1–S14.
- Thompson, J. N. (2005). **The geographic mosaic of coevolution**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Thompson, J. N. (2008). Coevolution, cryptic speciation, and the persistence of plant-insect interactions. p. 216-224 in Tilmon, K. ed. **Specialization, speciation, and radiation**. University of California Press, Berkeley.
- Videla, M., Valladares, G. R., & Salvo, A. (2012). Choosing between good and better: optimal oviposition drives host plant selection when parents and offspring agree on best resources. **Oecologia**, 169(3): 743-751.
- Winkler, IS, Mitter, C (2008). The phylogenetic dimension of insect-plant interactions: a review of recent evidence. In: Tilmon, KJ, Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects, 240-263. University of California Press.

Capítulo 2. Biogeografia histórica e filogeografia do uso de plantas hospedeiras em um complexo de espécies do gênero *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae)

Introdução

Ao longo da história evolutiva de um grupo de insetos herbívoros, a especialização pode ser considerada como a etapa final no processo de especiação (Thompson, 1994). Entretanto, a radiação adaptativa pode ser resultante de mudanças no uso de plantas hospedeiras em grupos de insetos de grande plasticidade e diversidade no uso de recursos, que se diferenciaram em detrimento da diversificação de seus hospedeiros, em resposta à herbivoria (Erich & Raven, 1964; Janz, 2011).

Além da seleção recíproca e da co-especiação, a diferenciação de linhagens de insetos pode ocorrer devido à mudança ou alternância no uso de plantas hospedeiras, da disponibilidade e da distribuição heterogênea desses recursos, tanto espacial como temporalmente (Nuismer & Thompson, 2006 ; Janz & Nylin, 2008; Fordyce, 2010; Nyman, 2010). Linhagens generalistas podem ser derivadas de ancestrais especialistas (Scheffer & Weigmann, 2000; Janz *et al.*, 2001), e a amplitude no uso de plantas hospedeiras varia em escalas de tempo tanto ecológicas quanto evolutivas (Erich & Raven, 1964; Thompson, 1994; Futuyma & Mitter, 1996; Janz & Nylin, 1998).

Insetos herbívoros podem ser plásticos quanto ao uso de plantas hospedeiras e aos fatores que promovem uma mudança no uso desses recursos. Associações entre insetos e plantas são resultado de uma mudança

contínua entre táxon de hospedeiras previamente existentes no repertório da dieta do herbívoro (Nyman, 2010). No entanto, os mecanismos ecológicos e genéticos associados à essas mudanças ainda não são bem compreendidos (Janz, 2011).

As borboletas do gênero *Actinote* evoluíram, possivelmente, a partir de um ancestral comum ao gênero *Acraea*, hoje encontrado apenas no continente africano, que utilizava como recurso plantas da família Urticaceae e se diferenciou no continente Sul-Americano, passando a explorar plantas da família Asteraceae (Silva-Brandão *et al.*, 2008). Muito provavelmente, essa mudança influenciou a diversificação do gênero, o que explica parte das relações filogenéticas e a especificidade de dieta dessas borboletas, mas que não preenche as lacunas, principalmente a evolução dos táxons mais recentes.

O clado mais recente desse gênero é formado por três espécies oligófagas, cuja espécie basal é *A. melanisans*, espécie monófaga do gênero e que ovipõe e alimenta-se apenas de plantas das espécies de *Mikania*. Entretanto, as espécies recentes, *A. pyrrha*, *A. pellenea*, e *A. carycina*, podem ovipor e alimentar-se em *Mikania* e em outros gêneros da mesma família de plantas (Asteraceae), exceto em um dos gêneros, *Chromolaena*, que é utilizado para oviposição e dieta, exclusivamente, por *A. pyrrha* (Francini, 1992).

Neste capítulo são discutida as relações filogenéticas e o uso de plantas hospedeiras pelas borboletas do gênero *Actinote*, bem como os processos ecológicos, biogeográficos e evolutivos que possam estar relacionados à diferenciação no uso das plantas. Dado o histórico evolutivo da tribo Acraeini com o uso de plantas hospedeiras, é possível que essa interação tenha relação com a especiação recente encontrada no gênero *Actinote*.

O complexo das três espécies recentes possui grande similaridade morfológica e ecológica. Não se pretende aqui estabelecer limites taxonômicos entre essas espécies, mas sim evidenciar padrões de diversidade e estruturação genética, e associá-los ao aumento da amplitude de dieta. A hipótese é a de que a oscilação entre estados monófagos e oligófagos possui um componente geográfico, caracterizado pelas diferenças genéticas nas populações, e na composição das comunidades de plantas.

Metodologia

Amostras

Foram coletadas amostras de larvas de *Actinote* encontradas nas folhas de quatro gêneros de plantas hospedeiras: *Austroeupatorium*, *Chromolaena*, *Mikania* e *Vernonanthura* em 13 sítios, numa amplitude geográfica de aproximadamente 1000 km (Figura 2.1). As localidades variam quanto às distâncias geográficas, sendo distantes entre si não menos do que 20 km. As lagartas foram criadas em laboratório até a emergência do adulto, e informações sobre o uso de plantas hospedeiras em cada uma das espécies foram obtidas no campo e incorporadas neste estudo.

As extrações de DNA foram feitas a partir de duas pernas de cada indivíduo adulto, e do tórax e cabeça das lagartas utilizando kit Wizard® (Promega), conforme recomendações do fabricante. DNA dos indivíduos de quatro espécies, *A. carycina*, *A. pyrrha*, *A. melanisans* e *A. pellenea*, oriundos dos 13 sítios e coletados nos quatro gêneros de plantas hospedeiras foi usado para as análises.

Foram amplificados, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) parte do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI) e do gene nuclear isocitrato desidrogenase (IDH). Aproximadamente 20 ng de DNA foi usado para amplificar os fragmentos. As reações de PCR foram feitas com um ciclo inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos (95°C/1 min; 45-55°C/1 min; 72°C /1min), e um ciclo final de extensão a 72°C/ 5 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, e purificados com enzima ExoSap™(Affymetrix), conforme recomendações do fabricante. As seqüências foram geradas pela Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

No total foram utilizadas 207 seqüências (aproximadamente cinco indivíduos de cada uma das quatro espécies de *Actinote* coletadas em cada sítio) de 660 pares de bases de parte do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI), e de 777 pares de bases do gene nuclear isocitrato desidrogenase (IDH). As seqüências foram analisadas e alinhadas no programa Geneious versão 8 (Kearse *et al.*, 2012) e ajustes, quando necessários, foram feitos manualmente no programa Bioedit (Hall, 1999).

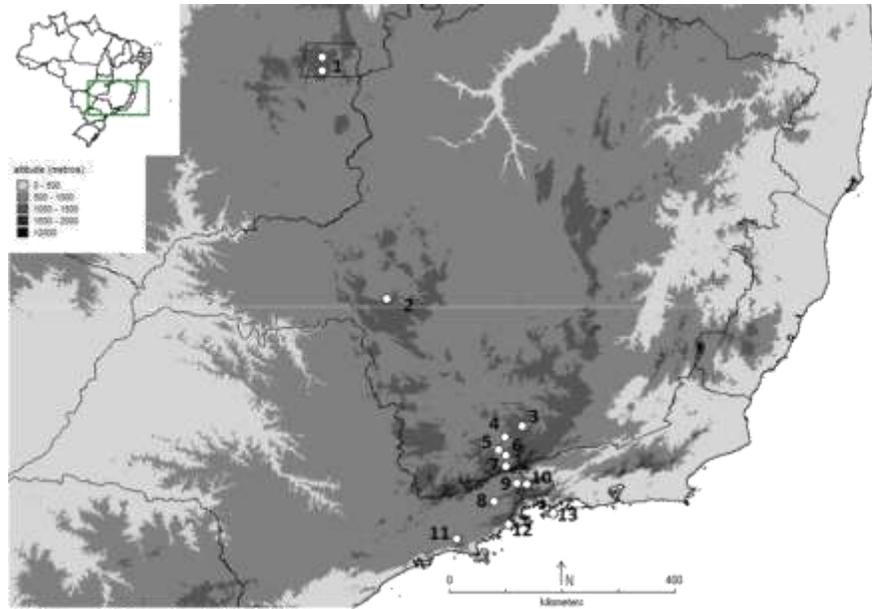


Figura 2.1. Mapa representando os sítios onde foram coletadas as larvas de *Actinote melanisans*, *A. pellenea*, *A. carycina*, e *A. pyrrrha*, em março, outubro e novembro de 2013. 1- Brasília (DF), 2-Araxá (MG), 3-Cruzília (MG), 4-Caxambu (MG), 5- São Lourenço (MG), 6- Pouso Alto (MG), 7-Passa Quatro (MG), 8-Silveiras (SP), 9-Serra da Bocaina (SP), 10-Goiabal (SP), 11-Salesópolis (SP), 12-Ubatuba (SP), 13-Ilha Grande (RJ).

Análise Filogenética

Para compreender mudanças da especialização por plantas hospedeiras ao longo da história evolutiva do gênero *Actinote*, foi feita uma reconstrução filogenética bayesiana do fragmento *barcode* do gene mitocondrial COI, utilizando as sequências das quatro espécies coletadas, além de outras três espécies, *A. discrepans*, *A. surima* e *A. parapeles* coletadas ocasionalmente, e de outras espécies de *Actinote* cujas informações foram extraídas do GeneBank, bem como da espécie andina *Altinote dicaeus*, utilizada como grupo externo.

A análise foi feita no programa BEAST (Drummond *et al.*, 2012), por uma cadeia de Markov Monte Carlo com 50000000 aleatorizações, seguindo o modelo de especiação de Yule. O modelo de substituição utilizado foi o de

Hasegawa, Kishino and Yano (HKY), estimado pelo programa Mega6 (Tamura *et al.*, 2011). A árvore foi enraizada a partir da cladogênese entre os dois gêneros, *Altinote* e *Actinote*, datada de 11,6 milhões de anos, segundo Whalberg *et al.* (2008). O período de orogenia da Serra do Mar foi considerado entre 47 e 27 milhões de anos (Hoorn, 1995; Almeida *et al.*, 1998; Antoneli *et al.*, 2009). A árvore final foi construída no programa TreeAnotator, sendo as primeiras 10000 árvores descartadas no início da análise (burn-in), e visualizada no programa Figtree 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Duas outras análises foram feitas, uma para o gene mitocondrial (COI) e outra para o gene nuclear isocitrato desidrogenase (IDH), com a finalidade de se obter árvores filogenéticas baseadas em modelos de coalescência no programa BEAST. Foi feita uma análise de modelos evolutivos no programa JModeltest (Darriba *et al.* 2012) para determinar os parâmetros. Foi utilizado o modelo de Tamura e Nei (1993) (TN93) e a análise foi feita com 50000000 de replicações na cadeia de Markov-Monte Carlo. As árvores finais de cada gene foram construídas no programa TreeAnotator, sendo as primeiras 10000 árvores descartadas no início da análise (burn-in), e foram visualizadas no programa Figtree 1.4

Estruturação geográfica e diversidade genética

Redes de haplótipos de cada um dos *locus* foram geradas, juntamente com as informações sobre o gênero da planta hospedeira utilizada, utilizando o programa PopArt. Para comparar a diversidade genética entre as espécies de borboletas foram feitas estimativas do número de haplótipos (h), número de

sítios segregados (S), diversidade haplotípica (hd), diversidade nucleotídica (Pi), segundo Nei (1997).

Foram realizados testes de neutralidade que permitem calcular o quanto da diversidade genética evolui aleatoriamente (sob efeito de deriva genética, por exemplo), através da estimativa dos índices de fixação “*D*” de Tajima (Tajima, 1989) e *F_s* de Fu (Fu, 1997). Valores negativos desses índices podem representar ausência de seleção e, considerando a panmixia em cada uma das espécies, podem também indicar expansão populacional, refletida pelo número excessivo de alelos observados, quando comparados com o esperado. Todas as estimativas foram feitas no programa DNASP 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009).

Computação Bayesiana Aproximada (ABC)

Foram estimados cenários evolutivos e histórico demográficos das populações da Serra do Mar, Serra da Mantiqueira, litoral, Serra da Canastra e do Distrito Federal, nas quatro espécies de *Actinote*, usando computação bayesiana aproximada (ABC, sigla em inglês para Approximate Bayesian Computation) no programa DIYABC versão 1.0 (Cornuet *et al.*, 2010). Esse método simula genealogias através de coalescência sob modelos evolutivos específicos usando parâmetros definidos a partir de distribuição *a priori* (ver anexo 2.1) e compara estatísticas dos dados simulados com os dados observados.

A similaridade das estatísticas entre simulações e os conjuntos de dados observados foram usados para calcular as probabilidades posteriores dos modelos e a distribuição dos parâmetros. Esses modelos foram construídos

manualmente, e total foram testados 16 cenários considerando cada uma das regiões como de origem, e diferentes possibilidades de expansão demográfica e biogeográfica. Especificamente para *A. pyrrha*, foram ainda estimados 18 cenários evolutivos quanto ao uso dos quatro gêneros de plantas hospedeiras onde essa espécie foi amostrada.

Resultados

A evolução da monofagia, ou a transição entre este estado e a oligofagia se deu repetidas vezes ao longo da história evolutiva do gênero *Actinote* (Figura 2.2). Os resultados obtidos dos genes mitocondrial e nuclear mostraram hipóteses filogenéticas distintas para o clado mais recente de *Actinote* (Figura 2.3). Essa diferença se dá principalmente com relação a duas espécies, *A. carycina* e *A. pellenea*, onde o gene nuclear apresentou cladogênese completa. Indivíduos de populações diferentes e que se alimentaram de plantas distintas não foram agrupados em clados. Exceto *A. pyrrha*, que apresentou cladogênese com alto suporte para os grupos de indivíduos que se alimentaram de folhas de plantas do gênero *Austroeupatorium*.

Quanto ao uso de diferentes gêneros de plantas hospedeiras, os haplótipos se distribuem de forma heterogênea dentro das espécies, não havendo agrupamentos de haplótipos encontrados em indivíduos que utilizam diferentes plantas (Figura 2.4). A diversidade genética foi maior entre espécies do que entre grupos que consomem a mesma planta, e o número de haplótipos aumenta na mesma direção da transição entre a espécie monófaga e as oligofagas (Tabela 2.1). Os valores de Tajima (D) e F_s de Fu mostraram que não há evidência de que seleção natural atuando sobre os dois marcadores

moleculares usados no estudo. Entre as espécies de borboletas, esses índices foram, em maior parte, não significativos, mesmo indicando sinal positivo para a presença de seleção natural como mecanismo na evolução dos marcadores estudados. Apenas duas exceções nas estimativas mostraram resultados significativos para a ausência de seleção.

A transição entre os estados monófago e oligófago não é caracterizada pelo aumento de diversidade genética, onde não há correlação entre o aumento da amplitude da dieta e a diversidade de haplótipos (Tabela 2.1; ver anexo 2.4). Assim como as hipóteses filogenéticas, os genes apresentaram padrões diferentes nessa correlação, o que pode estar relacionada às diferentes taxas de mutação.

Os resultados das simulações por computação bayesiana aproximada mostram que a hipótese da Serra do Mar como centro de diversificação é corroborada pelos modelos históricos de maior probabilidade (Figura 2.5). As populações do litoral descendem dessa mesma região, porém a colonização para o centro do Brasil pode ter ocorrido através de uma maior participação de populações oriundas da Serra da Mantiqueira. As populações dessas espécies nas duas regiões (Serra do Mar e Serra da Mantiqueira) podem juntas terem sido as ancestrais e o centro de diversificação e origem das demais populações no centro-sudeste, e possivelmente da região nordeste.

Com relação à evolução de linhagens de *A. pyrrha* e o gênero de planta hospedeira utilizada mostrou que o uso do gênero *Mikania* é basal em relação às linhagens que utilizaram as demais plantas hospedeiras como recurso (Figura 2.6). O resultado das simulações de modelos históricos populacionais

sugere, a partir do cenário de maior probabilidade, que linhagens de *A. pyrrha* se diferenciaram no uso de plantas hospedeiras, mudando primeiramente para o gênero *Austro eupatorium* e posteriormente para os gêneros *Vernonanthura* e *Chromolaena*, sendo essa última mais recente.

Tabela 2.1. Índices de diversidade nucleotídica e polimorfismo estimados por locus e por espécies, nas 12 localidades amostradas. (S) sítios segregados, (h) número total de haplótipos, (HD) diversidade haplotípica, (Pi) índice de diversidade Pi (Nei 1987), e os índices de neutralidade Tajima (1989) (*D*) e Fu (1993) (*F_s*).

	S	h	HD	Pi	Theta	D	F _s
COI							
<i>A.melanisans</i>	11	3	0,218	0,0126	0,00398	-2,2662*	1,267
<i>A.carycina</i>	6	7	0,608	0,00158	0,00237	-1,0757	-3,1569
<i>A.pellenea</i>	10	4	0,504	0,00474	0,00374	0,7772	4,920
<i>A.pyrrha</i>	18	7	0,1	0,00047	0,00465	-2,5120*	-5,302
IDH							
<i>A.melanisans</i>	7	5	0,668	0,00239	0,00341	-0,9813	-0,285
<i>A.carycina</i>	5	6	0,863	0,00215	0,00230	-0,2154	-1,657
<i>A.pellenea</i>	20	13	0,808	0,00493	0,00741	-1,1531	-3,425
<i>A.pyrrha</i>	39	22	0,824	0,00619	0,01267	-1,6393	-5,878

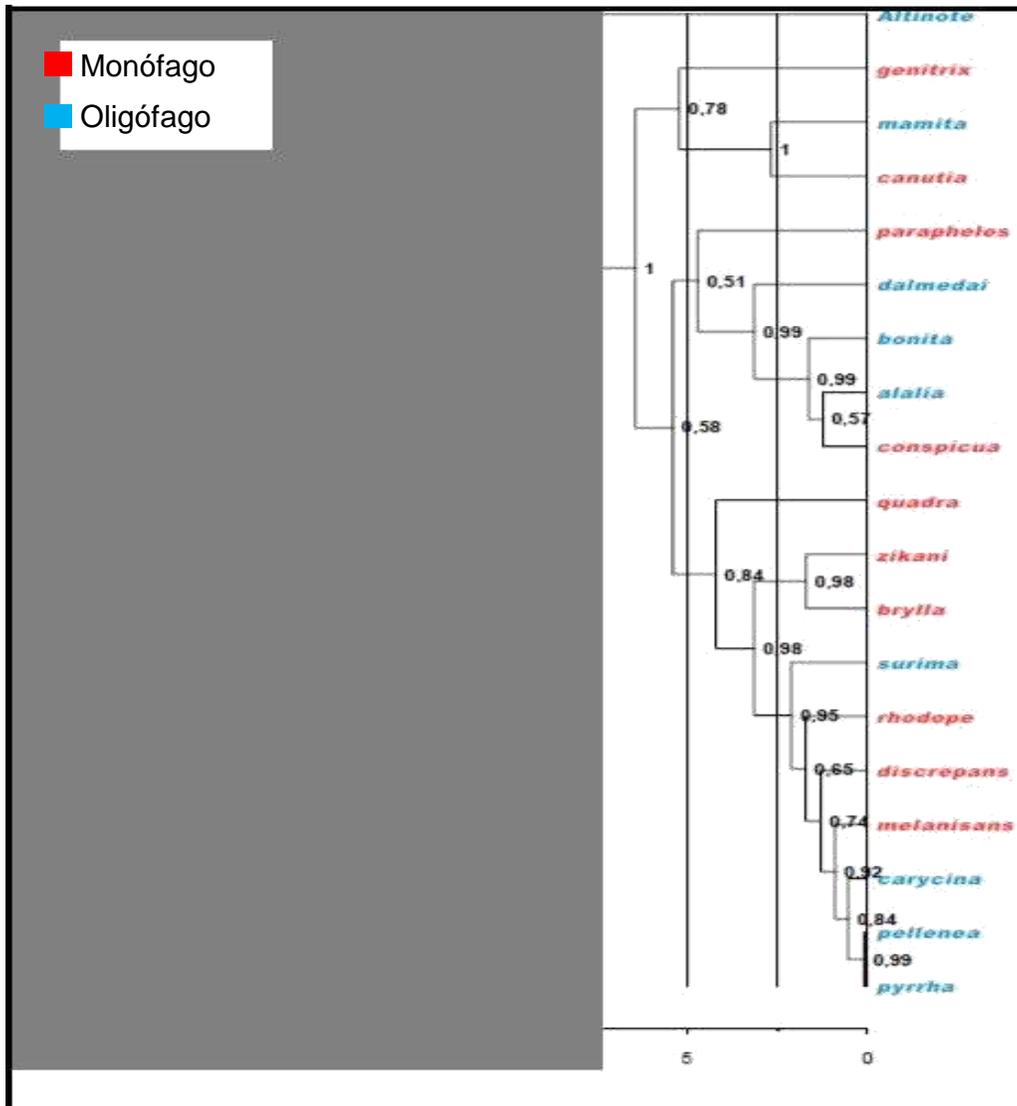


Figura 2.2. Reconstrução filogenética bayesiana de parte do gene citocromo oxidase. As cores indicam os estados de especialização no uso de plantas hospedeiras utilizados pelas espécies de *Actinote*. Os valores apresentados em cada nó indicam a probabilidade posterior. A faixa cinza representa a estimativa de início e o ápice da orogenia da Serra do Mar e Cordilheira dos Andes (entre 7,5 e 27 milhões de anos atrás), conforme indicado na escala abaixo da figura.

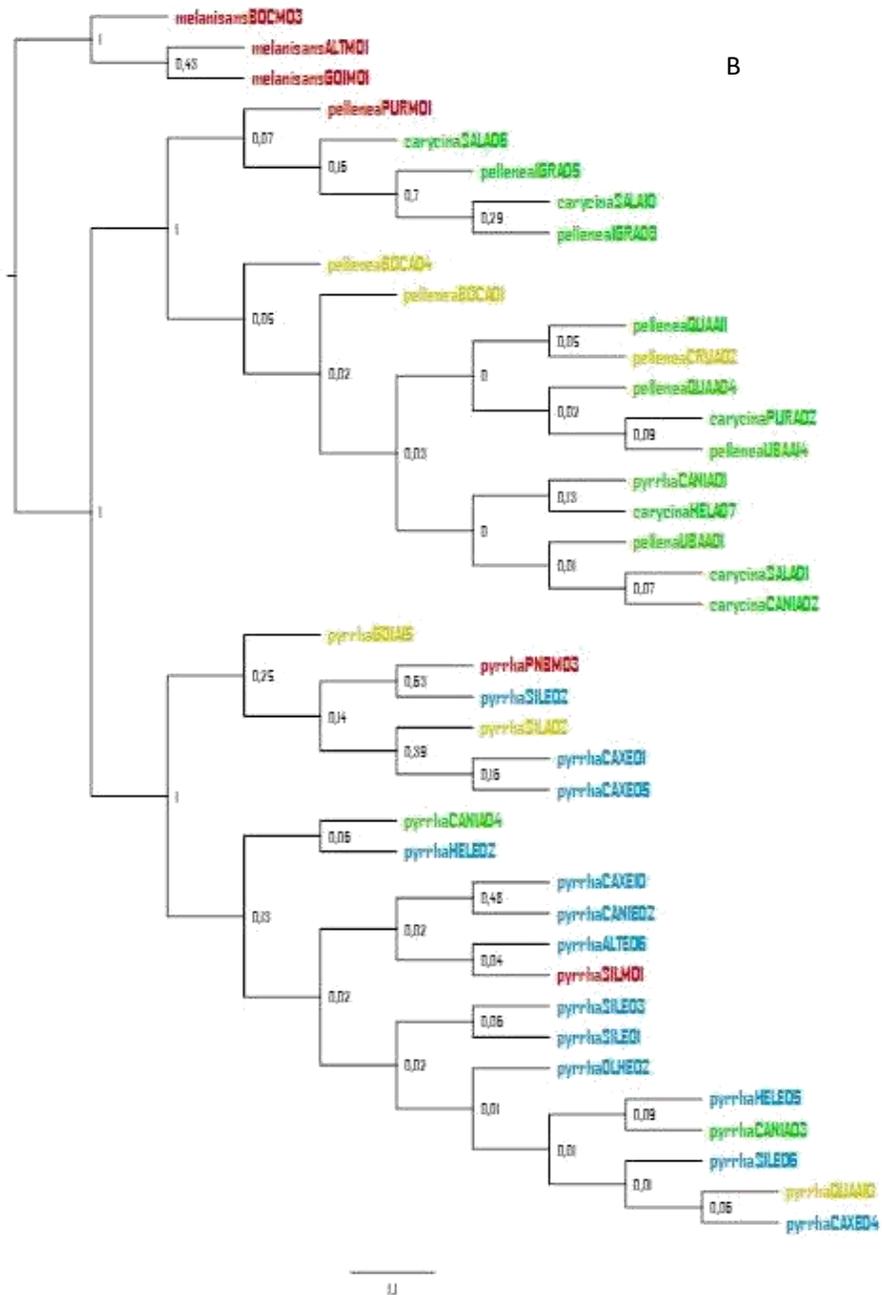


Figura 2.3. Reconstrução filogenética das espécies de *Actinote* baseada na genealogia do (A) gene mitocondrial e (B) gene nuclear. Os valores apresentados em cada nó indicam probabilidades posteriores para cada clado. As cores indicam os quatro gêneros de plantas hospedeiras: Austroeupatorium (verde), Chromolaena (azul), Mikania (vermelho) e Vernanthura (amarelo).

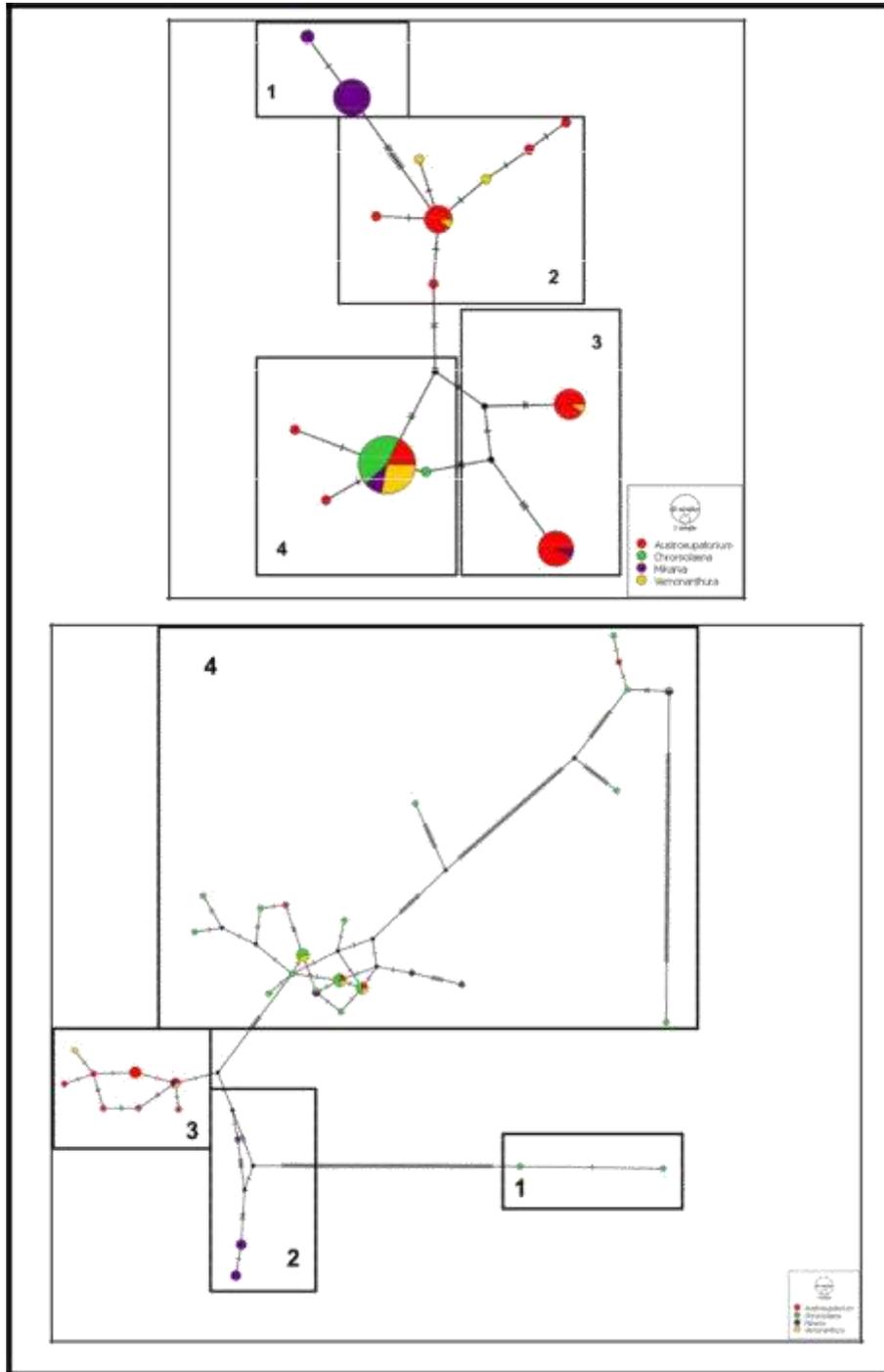
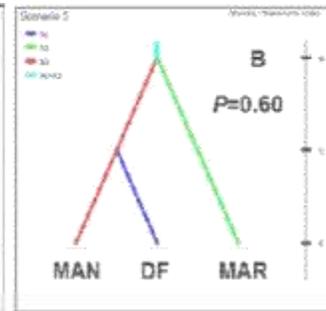
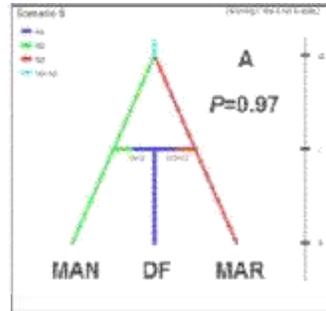


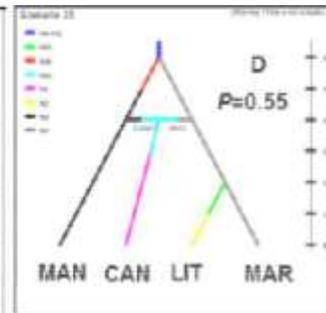
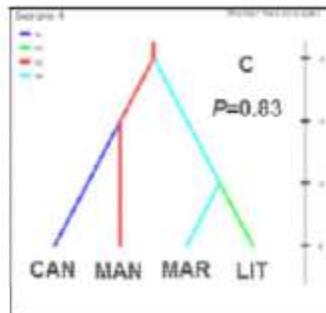
Figura 2.4. Distribuição dos haplótipos ao longo das diferentes espécies de *Actinote*, nos genes mitocondrial (A) e nuclear (B). As cores indicam indivíduos que usaram diferentes gêneros de plantas hospedeiras. Os números indicam as espécies utilizadas na construção da rede de haplótipos. Em (A): 1. *A. melanisans*, 2. *A. carycina*, 3. *A. pellenea*, 4. *A. pyrrha*. Em (B) 1. *A. surima*, 2. *A. melanisans*, 3. complexo *A. pellenea* + *A. carycina*, 4. *A. pyrrha*.



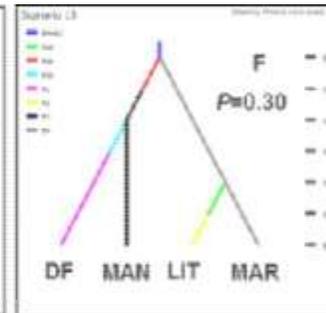
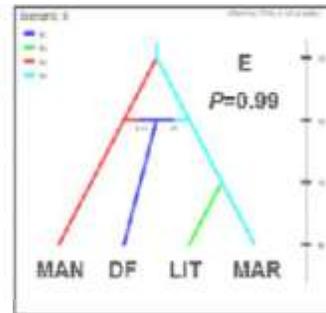
A. melanisans



A. carycina



A. pellenea



A. pyrrha

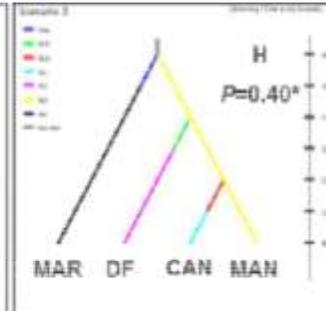
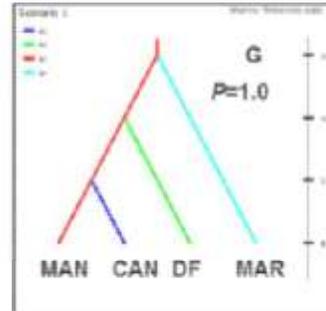


Figura 2.6. Dois melhores cenários históricos usados para avaliar as relações entre as regiões do Litoral (LIT), Serra do Mar (MAR), Serra da Mantiqueira (MAN), Serra da Canastra (CAN) e do Distrito Federal (DF). Os cenários representam as duas maiores probabilidades entre os modelos testados para *A. melanisans* (A e B), *A. carycina* (C e D), *A. pellenea* (E e F) e *A. pyrrha* (G e H). Os cenários A (0,97), C (0,83), E (0,99) e G (1,0) foram aqueles com maior probabilidades entre os modelos. As cores indicam que cada uma das populações apresentam diferentes tamanhos populacionais. Nas figuras D, F e H as diferenças de cores entre as dicotomias representam cenários onde pode ter havido declínio populacional após colonização

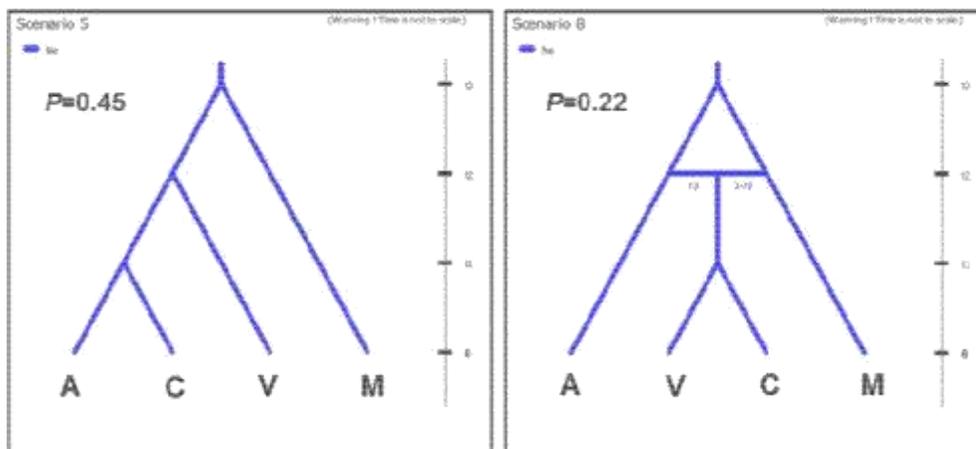


Figura 2.7. Os dois melhores cenários usados para avaliar as relações entre as linhagens de *A. pyrrha* encontradas nos quatro diferentes gêneros de plantas hospedeiras (A) *Austroeupatorium*, (C) *Chromolaena*, (M) *Mikania*, (V) *Vernanthura*. O cenário de maior probabilidade (0,45) simula uma diversificação para o uso de novas plantas tendo linhagens que foram encontradas em *Mikania* como ancestrais. O outro modelo (0,22) simula a diversificação para C e V a partir da divisão entre linhagens de A e M. Ambos os cenários foram estimados considerando que as linhagens possuem mesmo tamanho populacional.

Discussão

A hipótese da oscilação no uso de plantas hospedeiras prediz que insetos herbívoros especializados em uma única família de plantas, após eventos de especiação, poderiam gerar linhagens generalistas e estas, por sua vez, seriam um estado efêmero na história evolutiva (Janz *et al.*, 2006; Nylin *et al.*, 2014). O aparecimento de espécies oligófagas acontece repetidas vezes na história do gênero, alternando estados monófagos e culminando em um clado recente de espécies oligófagas muito parecidas tanto ecológica quanto geneticamente. O estado oligófago não parece necessariamente ser efêmero ao longo da filogenia, mas tem, provavelmente, sua origem associada às

espécies monófagas. Monofagia, por outro lado, é uma característica bastante conservada.

A hipótese filogenética e de história biogeográfica do gênero *Actinote* mostra que, apesar de não se saber ao certo se sua origem veio a partir de uma linhagem monófaga ou oligófaga de *Altinote*, o caráter ancestral é a monofagia e especialização no gênero *Mikania*. Se considerarmos a orogenia da Serra do Mar como um evento geológico e biogeográfico que poderia ter sido responsável pela diversificação de *Actinote* (ver Francini, 1989, 1992), é possível que a diferenciação populacional e especiação de plantas hospedeiras decorrentes desse evento possam ter relação com a diferenciação e especiação de *Actinote*.

O início da diversificação do gênero se deu logo após a orogênese da Serra do Mar, sendo provavelmente o evento geológico de maior importância. A evolução ou mudança para um estado oligófago em *Actinote* pode ter relação com diferenciação associada à planta hospedeira, que pode levar à formação de raças em populações de insetos parcialmente isoladas, que eventualmente tornam-se linhagens separadas e associadas a uma ou outra planta hospedeira (Peccoud *et al.*, 2009). Evolutivamente, plantas são ilhas em movimento em um espaço multidimensional de recursos, e a especiação de linhagens de insetos generalistas pode ter ocorrido através da mudança dentro de arquipélagos formados por plantas de níveis taxonômicos maiores (Nyman, 2010). Dessa forma, a amplitude de dieta pode levar a diversificação de espécies oligófagas, como observado na correlação entre o número de haplótipos e número de gêneros de plantas utilizados pelas quatro espécies de *Actinote* estudadas.

Por outro lado, o estreitamento de nicho leva a estruturas populacionais mais fragmentadas o que aumenta a possibilidade de especiação alopátrica (Futuyma & Moreno, 1988). A volta a um estado monófago em *Actinote* poderia ocorrer via nova especialização de uma linhagem no uso de *Mikania*, dependendo da estrutura populacional e das comunidades. Provavelmente, seria mantida assim como observado em *A. melanisans*, que possui baixa diversidade, em populações constantes de menor tamanho e de baixa diversidade intrapopulacional.

Espécies de moscas, por exemplo, respondem de maneiras independentes às forças evolutivas compartilhadas entre elas, com diferentes níveis de congruência com a estrutura genética das plantas (Espindola *et al.*, 2014). Os padrões geográficos de distribuição de plantas hospedeiras, encontrados em *Actinote* mostram um padrão mais complexo de distribuição dos haplótipos nas espécies oligófagas. A ausência de padrões congruentes entre a estrutura geográfica dos haplótipos e uso de plantas hospedeiras em cada sítio, reforça a hipótese de que diferenças na distribuição das plantas levem aos diferentes regimes de seleção.

No entanto, a mudança para uma nova planta é o mecanismo que melhor explica a evolução do uso de plantas hospedeira em Heliconiinae (Hardy & Otto, 2014). As espécies de *Actinote*, que fazem parte da mesma subfamília de borboletas também apresentam o mesmo padrão, onde a onde não há correlação entre diversidade genética e aumento da amplitude de dieta, o que estaria mais próximo da hipótese de dança filogenética das cadeiras (ver Anexo 2.4).

A história evolutiva das linhagens de *A. pyrrha* é melhor explicada sob um contexto geográfico do que através da evolução do uso de plantas hospedeiras. Provavelmente esse cenário seja predominante em todas as espécies oligófagas do gênero, e desta forma é possível que, dada a heterogeneidade entre os sítios nas regiões, a densidade de plantas hospedeiras seja importante no processo de mudança e alternância no uso de diferentes gêneros de plantas. A densidade de plantas hospedeiras varia entre as regiões estudadas, principalmente *Austroeupatorium*, que pode ser encontrado em grande número de indivíduos, mas este, porém, apresenta grande variação (ver anexo 2.5).

Monofagia é um caráter ancestral bastante conservado no gênero, e a diversificação de estados monófagos leva ao subsequente aparecimento de espécies oligófagas. As hipóteses do papel da diversificação no uso de plantas se tornam mais complexas quando testadas através das observações feitas em níveis taxonômicos mais baixos. Em nível de espécies, a amplitude de dieta pode contribuir mais para a especiação do que a mudança para um taxa diferente de planta.

No entanto, em linhagens ou populações que estão mais sujeitas aos efeitos da heterogeneidade de seus habitat, uma mudança para uma nova planta poderia ser o início para o aparecimento de linhagens monófagas dentro de espécies oligófagas, que conseqüentemente poderiam se tornar uma linhagem de espécie especializada em um único taxa de plantas hospedeiras. Nesse contexto, mesmo que herbívoros generalistas originem linhagens especialistas, o que estaria mais próximo da hipótese de oscilação de recursos, esse mecanismo de especiação simpátrica associada ao uso de plantas

hospedeiras, ainda assim estaria sujeito aos efeitos da heterogeneidade espacial dos recursos, como possível fator influenciando as mudanças evolutivas no uso de recursos.

Referências

- Almeida, F. F. M., & Carneiro, C. D. R. (1998). Origem e evolução da Serra do Mar. **Brazilian Journal of Geology**, 28(2): 135-150.
- Antonelli, A., Nylander, J. A., Persson, C., & Sanmartín, I. (2009). Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(24): 9749-9754.
- Cornuet, J. M., Santos, F., Beaumont, M. A., Robert, C. P., Marin, J. M., Balding, D. J., & Estoup, A. (2008). Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. **Bioinformatics**, 24(23), 2713-2719.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9 (8): 772-772.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 **Molecular Biology and Evolution** 29: 1969-1973.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18 (4): 586 - 608.
- Espíndola, A., Carstens, B. C., & Alvarez, N. (2014). Comparative phylogeography of mutualists and the effect of the host on the genetic structure of its partners. **Biological Journal of the Linnean Society**, 113 (4): 1021-1035.
- Francini, R.B. (1989). **Biologia e ecologia das borboletas Actinote (Lepidoptera: Nymphalidae) na transição subtropical no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Francini, R.B. (1992). Ecologia de taxocenoses de *Actinote* (Lepidoptera: Nymphalidae) em Asteraceae (Angiosperma: Magnoliatae) no Sudeste do Brasil: subsídios para conservação. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Fordyce, J. A. (2010). Host shifts and evolutionary radiations of butterflies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 277(1701): 3735-3743.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147(2), 915-925.
- Futuyma, D. J. & Mitter, C. (1996). Insect-plant interactions: the evolution of component communities. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 351(1345): 1361-1366.
- Futuyma, D. J., & Moreno, G. (1988). The evolution of ecological specialization. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 207-233.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.

- Hardy, NB, Otto SP (2014) Specialization and generalization in the diversification of phytophagous insects: tests of the musical chairs and oscillation hypotheses. *Proceedings Royal Society London B.*, 281:2013-2960.
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G. A., & Lorente, M. A. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, 23(3): 237-240.
- Janz, N. (2011). Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. **Annual Review Ecology Evolution Systematic**, 42: 71–89.
- Janz, N., Nyblom, K. & Nylin, S. (2001). Evolutionary dynamics of host-plant specialization: a case study of the tribe Nymphalini. **Evolution**, 55: 783-796.
- Janz, N., Sören, N., & Wahlberg, N. (2006). "Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects." **BMC Evolutionary Biology** 6: 4.
- Janz, N. & S. Nylin. (1998). Butterflies and plants: a phylogenetic study. **Evolution**, 52: 486–502.
- Janz, N., Nylin, S. (2008). The oscillation hypothesis of host-plant range and speciation. In: Tilmon, K.J. (Ed.). **Specialization, speciation and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects**. p. 203-215. University of California Press, Berkeley.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12): 1647-1649.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25(11): 1451-1452.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York.
- Nuismer, S. L. & Thompson, J. N. (2006). Coevolutionary alternation in antagonistic interactions. **Evolution**, 60 (11): 2207–2217.
- Nylin, S., Slove, J., & Janz, N. (2014). Host plant utilization, host range oscillations and diversification in nymphalid butterflies: a phylogenetic investigation. **Evolution**, 68 (1), 105-124.
- Nyman, T. 2010. To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant-feeding insects. **Biological Reviews**, 85: 393-411.
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., & Simon, J. C. (2009). A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(18): 7495-7500.

- Scheffer, S. J., & Wiegmann, B. M. (2000). Molecular phylogenetics of the holly leafminers (Diptera: Agromyzidae: Phytomyza): species limits, speciation, and dietary specialization. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 17(2): 244-255.
- Silva-Brandão, K. L., Wahlberg, N., Francini, R. B., Azeredo-Espin, A. M. L., Brown Jr., K. S., Paluch, M., Lees, D.C. & Freitas, A. V. L. (2008). Phylogenetic relationships of butterflies of the tribe Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) and the evolution of host plant use. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 46: 515–531.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123(3), 585-595.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10 (3): 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.
- Thompson, J. N. (1994). **The Coevolutionary Process**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Wahlberg, N., Leneveu, J., Kodandaramaiah, U., Peña, C., Nylin, S., Freitas, A. V., & Brower, A. V. (2009). Nymphalid butterflies diversify following near demise at the Cretaceous/Tertiary boundary. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 276(1677): 4295-4302.

Capítulo 3. Variação geográfica, uso de plantas hospedeiras e estrutura genética de *Actinote pyrrha* (Nymphalidae: Acraeini)

Introdução

Insetos geralmente apresentam preferências alimentares por diferentes espécies de plantas (Thompson & Pellmyr, 1991). Mudanças no uso de plantas hospedeiras associadas à colonização de novas plantas é uma das principais fontes promotoras de diversificação em insetos herbívoros (Fordyce, 2010; Janz, 2011).

Enquanto insetos herbívoros especialistas em dieta possuem um número menor de plantas hospedeiras em seu repertório, os generalistas são capazes de se desenvolverem em ampla diversidade de plantas. Espécies generalistas apresentam ainda diferenças no desenvolvimento e sobrevivência quando ovipõem e se desenvolvem em diferentes linhagens de plantas em diferentes regiões geográficas (Jaenike, 1990; Thompson & Pellmyr 1991; Janz & Nylin, 1997; Janz *et al.*, 2006).

Mudanças no uso de plantas hospedeiras podem resultar em diferenciação genética como consequência de fluxo gênico reduzido, e de especiação devido ao acúmulo de mutações que causam isolamento reprodutivo (Coyne & Orr, 2004). A intensidade e a direção da seleção natural é variável no espaço, e podem levar às diferenças nos traços e interações ao longo das populações (Thompson, 1994, 2005), como consequência de padrões espaciais variáveis de seleção (Nuismer *et al.*, 1999, 2000; Gomez *et al.*, 2009; Thrall *et al.*, 2012).

Adaptação local de insetos herbívoros às defesas de plantas tem o potencial de facilitar a colonização de novas hospedeiras (Desurmont *et al.*, 2012). Linhagens de insetos herbívoros que evoluíram para o uso de uma nova planta hospedeira apresentam melhor desempenho do que aquelas encontradas em outras plantas (Magalhães *et al.*, 2009). As larvas sobrevivem mais quando há preferência por planta hospedeira (maior especialização), e as fêmeas depositam mais ovos quando o desempenho do imaturo é maior (Gripenberg *et al.*, 2010).

Neste capítulo, são combinados dados e análises de estruturação geográfica populacional e de uso de espécies de plantas hospedeiras em populações de *Actinote pyrrha*. A hipótese é de que linhagens de *A. pyrrha* apresentem estruturação, onde a variação genética pode ser encontrada entre populações ou linhagens que utilizam diferentes plantas hospedeiras, e esta relacionada à preferência por gênero de planta hospedeira, caracterizada pelas diferenças na probabilidade de oviposição.

Metodologia

Amostragem

Foram estudadas sete sítios ao longo de 2013, em três diferentes períodos do ano (Figura 3.1). Foram coletadas 57 amostras de grupos de ovos e larvas (aproximadamente oito grupos por sítio) e 43 amostras de adultos (aproximadamente seis por sítio) de *A. pyrrha*. As lagartas foram criadas no laboratório até emergência do adulto e alimentadas com as folhas da espécie de planta na qual foi coletada. Cada indivíduo adulto coletado ou oriundo de

criação foi depositado na Coleção Entomológica do Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília. O DNA foi extraído a partir do macerado das pernas e da parte anterior das larvas (tórax + cabeça). Para as extrações foi usado o kit Wizard® (Promega), conforme recomendações do fabricante.

Foram amplificados, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) parte do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI) e do gene nuclear isocitrato desidrogenase (IDH). Aproximadamente 20 ng de DNA foi usado para amplificar os fragmentos. As reações de PCR foram feitas com um ciclo inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos (95°C/1 min; 45-55°C/1 min; 72°C /1min), e um ciclo final de extensão a 72°C/ 5 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, e purificados com enzima ExoSap™(Affymetrix), conforme recomendações do fabricante. As seqüências foram geradas pela Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

Estrutura genética

No total foram usadas 100 seqüências de 660 pares de bases de parte do gene mitocondrial citocromo oxidase (COI), e de 777 pares de bases do gene isocitrato desidrogenase (IDH). As seqüências foram analisadas e alinhadas, utilizando o programa Geneious. Os ajustes, quando necessários, foram feitos manualmente no programa Bioedit (Hall, 1999). A análise de distribuição dos haplótipos foi feita no programa DNASP 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009). A partir de dados multilocus dos haplótipos nos indivíduos das populações, foi estimado o número de grupos genéticos no programa Geneland, em ambiente R. Esse programa permite associar as probabilidades de cada uma das populações pertencerem a um ou a mais grupos genéticos,

associando frequências alélicas à localização geográfica baseada nas coordenadas dos sítios das amostras.

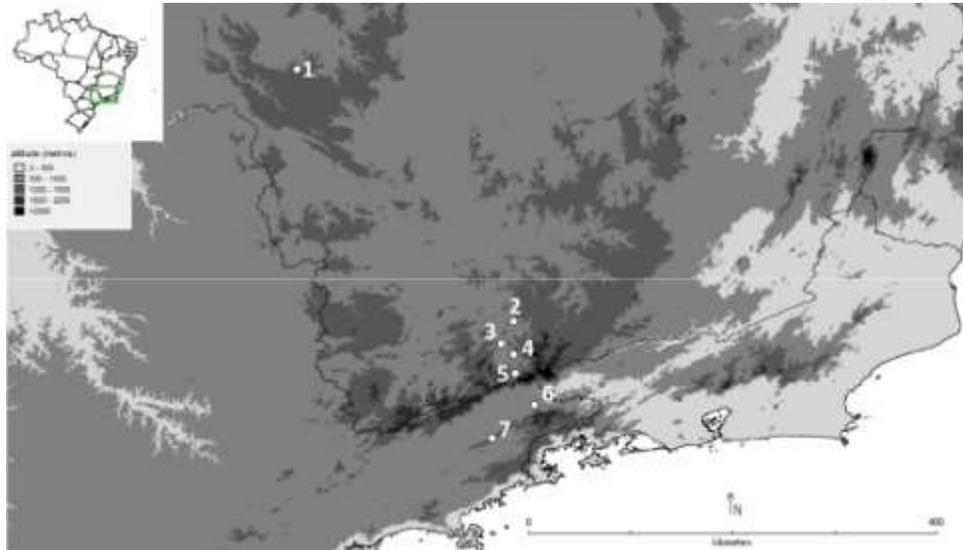


Figura 3.1. Mapa indicando as localidades onde foram coletadas as populações de *Actinote pyrrha*, entre maio e dezembro de 2013, na Serra do Mar, Serra da Mantiqueira, região da Serra da Canastra. 1- Araxá, MG (ARA), 2- Caxambu, MG (CAX), 3- São Lourenço, MG (HEL), 4- Pouso Alto, MG (ALT), 5- Passa Quatro, MG (QUA), 6- Goiabal, SP (GOI), 7- Silveiras, SP (SIL).

Preferência por plantas hospedeiras

O termo preferência é tratado neste trabalho como sendo a probabilidade de encontrar oviposição nas diferentes plantas do repertório da espécie. O termo aqui usado não tem relação com a preferência associada à especificidade ou ao valor reprodutivo dispendido pela fêmea ao realizar a oviposição em uma determinada planta (Singer, 1982). O número de oviposição em cada sítio e cada planta foi utilizado para estimar a probabilidade de se encontrar ovos ou larvas de *A. pyrrha* nos quatro gêneros de plantas

hospedeiras: *Austroeupatorium*, *Chromolaena*, *Mikania* e *Vernonanthura*. Um modelo hierárquico bayesiano foi usado para estimar a preferência de *A. pyrrha* pelas espécies de plantas hospedeiras. A análise foi feita em ambiente R, utilizando o pacote “bayespref” (Fordyce *et al.*, 2011). Probabilidades de preferência em cada população foram estimadas a partir de 50.000 passos na cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) seguido de 10.000 aleatorizações.

Resultados

Foram encontrados no total nove haplótipos para o gene mitocondrial COI, e 38 haplótipos para o gene IDH, que estavam distribuídos em três grupos genéticos (Figura 3.2). A probabilidade de cada indivíduo pertencer a um determinado grupo genético ou a outro variou geograficamente (Anexo 3.1), sendo que a população de Caxambu apresentou maior número de indivíduos com probabilidade de pertencerem a um único grupo. Essa população, no entanto, foi muito heterogênea em termos de estrutura genética, e não foi encontrado nenhum padrão geográfico definido de distribuição da estrutura genética de *A. pyrrha* (Figura 3.2).

As probabilidades de preferência por plantas hospedeiras também variaram geograficamente (Anexo 3.2), mas possuem distribuição geográfica associada às populações locais. Essa distribuição foi heterogênea, sendo que a probabilidade de se encontrar ovos ou lagartas de *A. pyrrha* em diferentes plantas esta estruturada em nível populacional.

A distribuição das populações de *A. pyrrha* variou dentro do espaço multidimensional de probabilidade de preferência e de probabilidade de agrupamento genético (Figura 3.5). Quando agrupadas, as distribuições das

probabilidades de preferência se tornam homogêneas dentro de cada agrupamento genético (Figura 3.6).

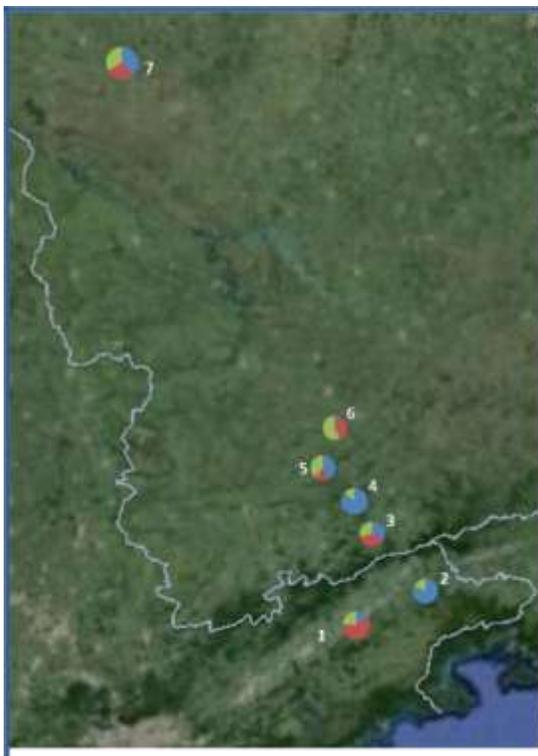


Figura 3.2. Distribuição geográfica das probabilidades das populações pertencerem a um ou outro grupo genético. Os números indicam as populações: 1-GOI, 2-SIL, 3-QUA, 4-ALT, 5-HEL, 6-CAX, 7-ARA. O calculo das probabilidades foi feito após 100000 de replicações de MCMC

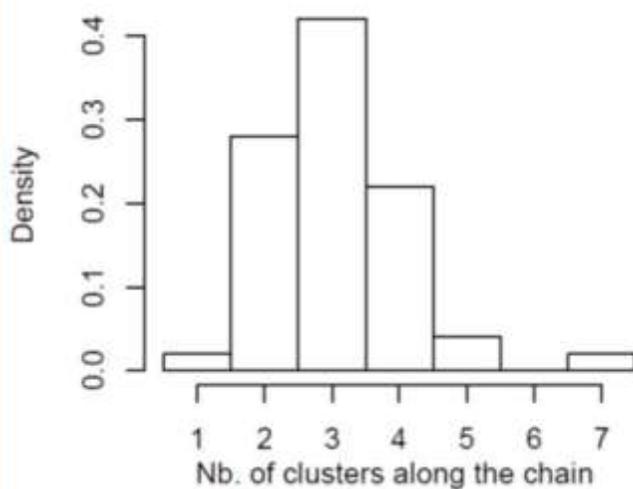


Figura 3.3. Densidade da probabilidade do número de clusters ao longo da cadeia de Markov-Monte Carlo após 50000 interações

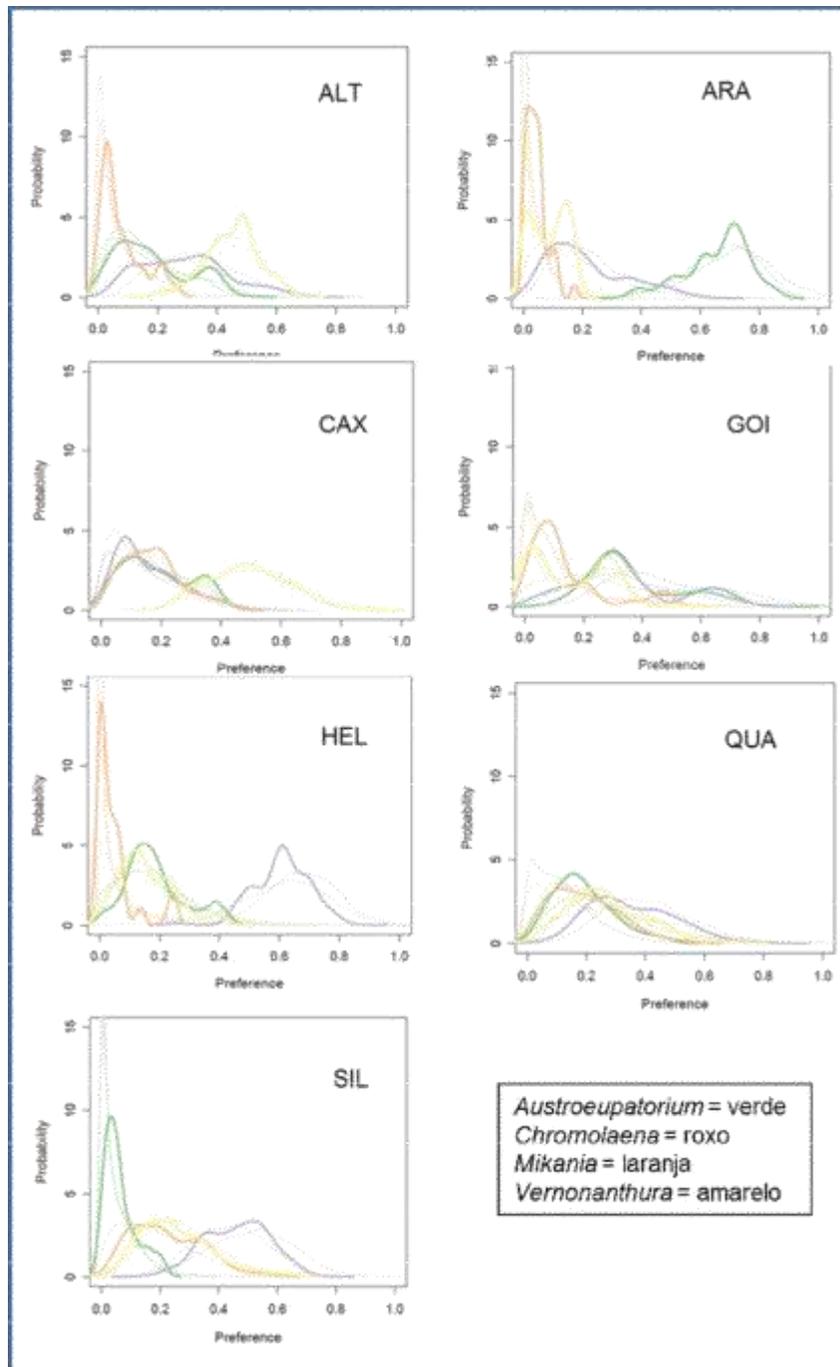


Figura 3.4. Preferência por plantas hospedeiras nas populações. As curvas indicam probabilidade posterior em nível populacional de preferência das quatro espécies de plantas hospedeiras. Valor do critério de informação do desvio (DIC, sigla em inglês) = -33.06998. Aqui não precisa do DIC pq não comparei modelos. 1- Araxá, MG (ARA), 2- Caxambu, MG (CAX), 3- São Lourenço, MG (HEL), 4- Pouso Alto, MG (ALT), 5- Passa Quatro, MG (QUA), 6- Goiabal, SP (GOI), 7- Silveiras, SP (SIL).

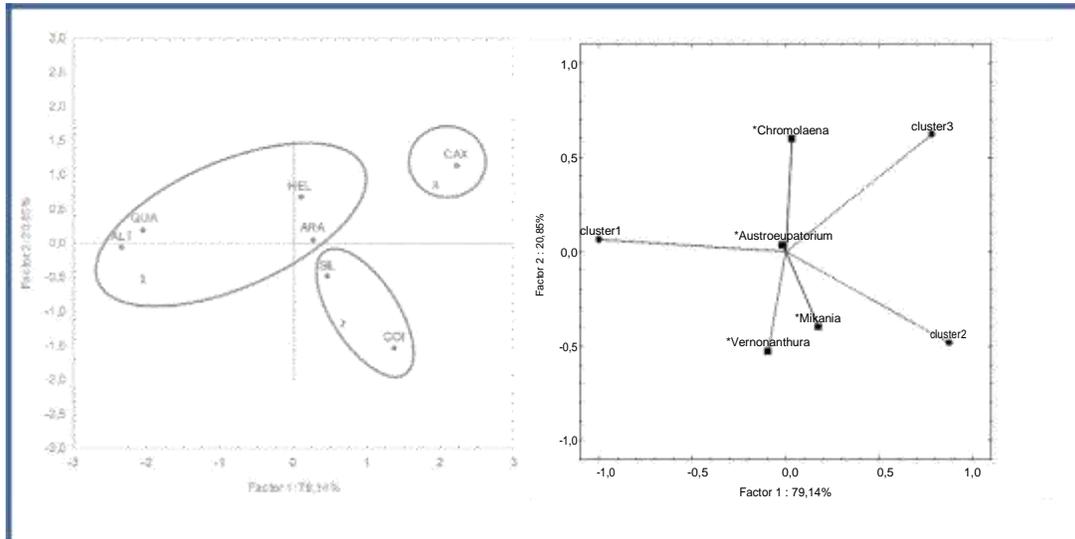


Figura 3.5. Resultado da análise multivariada de componentes principais (PCA), mostrando a distribuição das populações de *A. pyrrha* no espaço multidimensional de probabilidade de preferência por plantas e de agrupamento genético. (B) contribuição dos vetores agrupamento genético e probabilidade de oviposição.

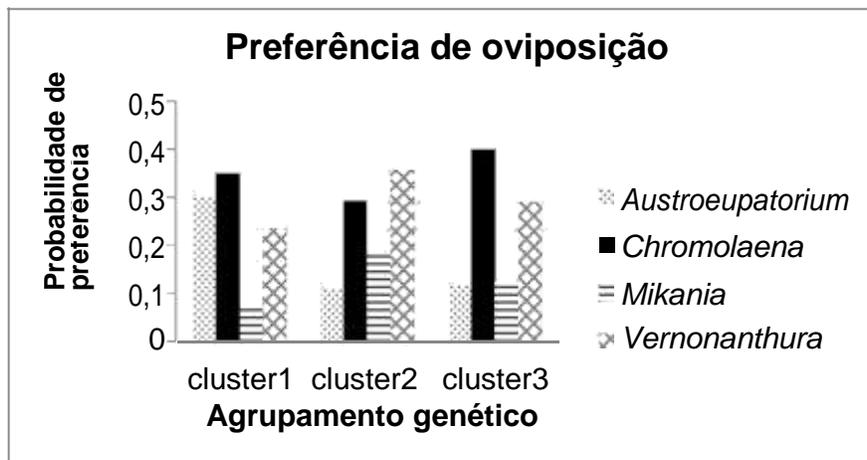


Figura 3.6. Probabilidade média de preferência de oviposição de *A. pyrrha* nos quatro gêneros de plantas amostradas, ao longo dos três agrupamentos genéticos estimados.

Discussão

A oportunidade de se estudar mudanças populacionais no uso de plantas hospedeiras permite caracterizar os efeitos de um possível ajustamento entre diversidade genética e ecológica. Quando o fluxo gênico é limitado e há forte seleção natural, espécies podem tornar-se adaptadas localmente, em regimes que diferem ao longo de sua amplitude de distribuição geográfica, levando à preferência por determinada planta hospedeira (Wiklund, 1981).

Por outro lado, a baixa diversidade e o alto fluxo gênico podem diminuir os efeitos de seleção. Em populações geograficamente isoladas, a seleção natural pode favorecer a preferência pelo aumento da eficiência das fêmeas na busca por plantas para oviporem (Forister *et al.*, 2012). Em *Lycaeides melissa* Nabokov (1944) (Lycaenidae), a preferência por uma planta específica pode aparecer e desaparecer de forma independente, devido à variação geográfica de padrões de oviposição.

Adaptações ligadas a traços fenotípicos, considerando sua distribuição espacial podem causar reduções pleiotrópicas no fluxo gênico (Mallet *et al.*, 2009). Arquitetura genética e a conectividade das populações podem ser responsáveis para que as mudanças aconteçam de maneira mais lenta. Assim, a canalização de traços pode ser favorecida sobre plasticidade em ambientes invariáveis, especialmente se plasticidade tiver um custo muito alto (Pigliucci & Murren, 2003).

No entanto, as probabilidades de preferência variaram geograficamente, assim como os agrupamentos genéticos, e ambos apresentaram distribuição espacial heterogênea. Essa espécie de borboleta utiliza plantas hospedeiras

em um mosaico geográfico de distribuição, e essa heterogeneidade espacial favorece a manutenção de diferenças genéticas e fenotípicas sob efeito populacional local. A distribuição heterogênea das plantas pode levar ao uso diferencial de plantas em nível populacional (Thompson, 2005), e talvez algumas características genéticas sejam mantidas localmente, mesmo quando não há isolamento geográfico.

Quando a especiação é recente, como é o caso de *A. pyrrha*, pode haver retenção de um polimorfismo ancestral, e a diferenciação genética pode ter uma consequência geográfica maior do que a seleção de espécies de plantas hospedeiras (Becerra & Venable, 1999). Apesar da distância geográfica explicar parte da variação genética em populações, a especificidade de dieta local por plantas hospedeiras também pode influenciar a variação espacial de caracteres genéticos (Drummond *et al.*, 2010).

A interface entre adaptação local, geografia e demografia podem, conjuntamente, ser determinantes para que ocorra diferenciação pelo uso de novas plantas hospedeiras (Darwell *et al.*, 2014). A probabilidade em se encontrar grupos de ovos ou de lagartas de *A. pyrrha* parece ter grande influência da disponibilidade de plantas em cada sítio. A heterogeneidade na distribuição desses recursos influenciariam a história evolutiva dessa espécie, numa combinação de estruturação geográfica e da variação geográfica na preferência (probabilidade de ovipor) do herbívoro pelas plantas hospedeiras.

Aparentemente, as populações de *A. pyrrha* compartilham das mesmas características genéticas. Fêmeas de Lepidoptera podem individualmente apresentar diferenças entre elas na escolha de qual planta ovipor, porém essas

diferenças não existem ou são menores quando se comparam os padrões em nível populacional (Nylín *et al.* 2005).

A correlação entre a estrutura genética espacial e a preferência de plantas hospedeiras de *A. pyrrha* em escala local possui um componente geográfico. Apesar das probabilidades de preferência variarem entre as populações, e a estrutura genética variar dentro da mesma escala, quando agrupadas, a preferência de plantas hospedeiras é a mesma entre os agrupamentos genético. As diferenças são maiores em nível populacional, e os padrões observados na espécie estão estruturados em um mosaico de distribuição, reforçando a ideia de que estudos que procurem correlacionar traços fenotípicos e genéticos devem procurar observar sua distribuição e estrutura em diferentes níveis taxonômicos e escalas espaciais.

Referências

- Becerra, J. X. & Venable, D. L. (1999). Macroevolution of insect–plant associations: the relevance of host biogeography to host affiliation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96(22): 12626-12631.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). **Speciation** (Vol. 37). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Darwell, C. T., Fox, K. A., & Althoff, D. M. (2014). The roles of geography and founder effects in promoting host-associated differentiation in the generalist bogus yucca moth *Prodoxus decipiens*. **Journal of Evolutionary Biology**, 27(12), 2706-2718.
- Desurmont, G. A., Hérard, F., & Agrawal, A. A. (2012). Oviposition strategy as a means of local adaptation to plant defence in native and invasive populations of the viburnum leaf beetle. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 279(1730), 952-958.
- Drummond, C. S., Xue, H. J., Yoder, J. B., & Pellmyr, O. (2010). Host-associated divergence and incipient speciation in the yucca moth *Prodoxus coloradensis* (Lepidoptera: Prodoxidae) on three species of host plants. **Heredity**, 105(2): 183-196.
- Fordyce, J. A., Gompert, Z., Forister, M. L., & Nice, C. C. (2010). A hierarchical Bayesian approach to ecological count data: a flexible tool for ecologists. **PloS one**, 6(11): e26785.
- Forister, M. L., Dyer, L. A., Singer, M. S., Stireman III, J. O., & Lill, J. T. (2012). Revisiting the evolution of ecological specialization, with emphasis on insect-plant interactions. **Ecology**, 93(5), 981-991.
- Gómez, J. M., Perfectti, F., Bosch, J. & Camacho, J. P. M. (2009). A geographic selection mosaic in a generalized plant-pollinator-herbivore system. **Ecological Monographs**, 79(2): 245-263.
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., & Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference– performance relationships in phytophagous insects. **Ecology Letters**, 13(3), 383-393.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98.
- Jaenike, J. (1990). Host specialization in phytophagous insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 21: 243-273.
- Janz, N. 2011. Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. **Annual Review Ecology Evolution Systematics**, 42: 71–89.
- Janz, N., & Nylin, S. (1997). The role of female search behaviour in determining host plant range in plant feeding insects: a test of the information processing hypothesis. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 264 (1382): 701-707.

- Janz, N., Nylin, S., & Wahlberg, N. (2006). Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. **BMC Evolutionary Biology**, 6(1): 4.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452.
- Magalhães, S., Blanchet, E., Egas, M., & Olivieri, I. (2009). Are adaptation costs necessary to build up a local adaptation pattern?. **BMC Evolutionary Biology**, 9 (1): 182.
- Mallet, J., Meyer, A., Nosil, P., & FEDER, J. L. (2009). Space, sympatry and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, 22(11): 2332-2341.
- Nuismer, S. L., Thompson, J. N., & Gomulkiewicz, R. (1999). Gene flow and geographically structured coevolution. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 266 (1419): 605-609.
- Nuismer, S. L., Thompson, J. N., & Gomulkiewicz, R. (2000). Coevolutionary clines across selection mosaics. **Evolution**, 54(4): 1102-1115.
- Nylin, S., Nygren, G. H., Windig, J. J., Janz, N., & Bergström, A. (2005). Genetics of host-plant preference in the comma butterfly *Polygonia c-album* (Nymphalidae), and evolutionary implications. **Biological Journal of the Linnean Society**, 84(4): 755-765.
- Pigliucci, M., & Murren, C. J. (2003). Perspective: genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? **Evolution**, 57(7): 1455-1464.
- Singer, M. C. (1982). Quantification of host preference by manipulation of oviposition behavior in the butterfly *Euphydryas editha*. **Oecologia**, 52(2), 224-229.
- Thompson, J. N. (1994). **The Coevolutionary Process**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Thompson, J. N. (2005). **The Geographic Mosaic of Coevolution**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Thompson, J. N., & Pellmyr, O. (1991). Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, 36(1): 65-89.
- Thrall, P. H., Laine, A. L., Ravensdale, M., Nemri, A., Dodds, P. N., Barrett, L. G., & Burdon, J. J. (2012). Rapid genetic change underpins antagonistic coevolution in a natural host-pathogen metapopulation. **Ecology Letters**, 15(5): 425-435.

Wiklund, C. (1981). Generalist vs. specialist oviposition behaviour in *Papilio machaon* (Lepidoptera) and functional aspects on the hierarchy of oviposition preferences. **Oikos**, 36 (2): 163-170.

Considerações finais

A interação do gênero *Actinote* com suas plantas hospedeiras é um bom modelo para estudos que buscam associar história evolutiva a processos ecológicos. São espécies que respondem rápido a alterações no ambiente, ocorrem em simpatria e compartilham recursos. Apesar da grande similaridade ecológica entre as espécies, o que pode ser observado principalmente em *A. pellenea* e *A. carycina*, uma combinação de processos biogeográficos históricos, distribuição heterogênea das plantas hospedeiras e dinâmica populacional de padrões de oviposição parecem influenciar a evolução desses organismos em diferentes escalas.

A mudança, ou a alternância no uso de plantas hospedeiras por insetos herbívoros é mais fácil de ocorrer entre plantas filogeneticamente próximas. Possivelmente possa haver uma relação com diferenças químicas entre os gêneros de plantas amostradas, e possivelmente entre as populações, sendo essa uma característica importante para melhor compreensão do papel dessas plantas na especiação do gênero *Actinote*. Sua influência sobre a ecologia populacional de *Actinote* pode ser grande, o que poderia explicar muito dos padrões observados nesse trabalho.

Perspectivas futuras

Uma característica ecológica a ser observada, e que poderia acrescentar muito para o entendimento desses padrões, seria a da influência direta das taxas de parasitismo em diferentes instares. Algumas observações sugerem a presença de diferentes ordens de parasitoides atacando diferentes estágios de desenvolvimento das lagartas de *Actinote*. Vespas da família Braconidae são

encontradas nos instares iniciais e moscas da família Tachinidae nos estágios finais de desenvolvimento. Além disso, hiperparasitoides da família Pirlampidade (dado obtido durante a criação das lagarta) podem aparecer como um quarto nível trófico, no topo dessa cascata ecológica.

Dados sobre parasitismo em ovos são inexistentes e poderia ser uma informação relevante. É possível observar em folhas de *Austroeupatorium inulaefolium*, ovos de *A. pellenea* serem atacados por formigas (R.B. Francini, comunicação pessoal) que, aparentemente são repelidas, talvez pela presença de compostos químicos envolvidos na maturação dos ovos ou ate logo após a fecundação.

O uso de novas metodologias moleculares, associadas a experimentos de preferencia e tolerância poderiam resolver os problemas de teste de hipóteses em níveis taxonômicos mais baixos. Com o uso de epigenética, poderia-se associar diferenças genéticas a diferentes níveis de tolerância, e caracteriza-las dentro e entre linhagens oligófagas e monófagas. Métodos de sequenciamento de nova geração poderiam auxiliar na busca de regiões do genoma que estejam sob seleção, ou encontrar diferenças e genes ligados a diversificação do uso de plantas hospedeiras.

Anexos

Anexo 1.1. Dados dos doze sitio amostrados entre maio e dezembro de 2013. (ALT) Pouso Alto, MG, (ARA) Araxa, MG, (CAX) Caxambu, MG, (FPA) Cruzília, MG, (GOI) Goiabal, MG, (HEL) São Lourenço, MG, (IGR) Ilha Grande, RJ, (PUR) Puruba, SP, (QUA) Passa Quatro, MG, (SAL) Salesópolis, SP, (SIL) Silveiras, SP, (UBA) Ubatumirim, SP. (U) unidade amostral em cada sitio, (alt) altitude, (temp) temperatura media anual média (°C), (prec) precipitação media anual (mm), (T) tamanho do transecto (metros), Área estimada através do tamanho do transecto multiplicado por 2, o que representa metros adentro da mata, em esforço gasto para vistoriar as plantas.

sítio	alt	temp	prec	T	área
ALT	870	19,3	1500	150	300
ARA	1005	20,2	1626	1186	2372
CAX	799	18,8	1468	1093	2186
FPA	962	18,1	1544	103	206
GOI	909	17,1	1421	429	858
HEL	840	19,6	1520	569	1138
IGR	0	23,2	1791	3518	7036
PUR	0	22,5	2552	1528	3056
QUA	896	18,7	1498	600	1200
SAL	1005	17,4	1609	207	414
SIL	658	19,5	1456	241	482
UBA	0	22,5	2552	431	862

Anexo 1.2. Densidade de plantas nos sítios amostrados, baseado no número de plantas vistoriadas e a área percorrida. (ALT) Pouso Alto, MG, (ARA) Araxá, MG, (CAX) Caxambu, MG, (FPA) Cruzília, MG, (GOI) Goiabal, MG, (HEL) São Lourenço, MG, (IGR) Ilha Grande, RJ, (PUR) Puruba, SP, (QUA) Passa Quatro, MG, (SAL) Salesópolis, SP, (SIL) Silveiras, SP, (UBA) Ubatumirim, SP.

	<i>Austroeupeatorium</i>	<i>Chromolaena</i>	<i>Mikania</i>	<i>Vernonanthura</i>
ALT	0,0047	0,0189	0,0255	0,0608
ARA	0,0737	0,0463	0,0115	0,0034
CAX	0,0000	0,0354	0,0055	0,0349
FPA	0,2791	0,0103	0,0634	0,0297
GOI	0,0210	0,0269	0,0561	0,0970
HEL	0,0288	0,0204	0,0391	0,0000
IGR	0,0256	0,0034	0,0006	0,0020
PUR	0,0382	0,0000	0,0074	0,0000
QUA	0,0683	0,0233	0,0317	0,0117
SAL	0,1401	0,0000	0,0290	0,0000
SIL	0,0080	0,0616	0,0370	0,0673
UBA	0,1067	0,0139	0,0000	0,0000

Anexo 1.3. Variância dos componentes da análise de redundância discriminante da distribuição de plantas hospedeiras em função das características ambientais de cada sítio. (Df) graus de liberdade; (Var) variância; (N.Perm) número de permutações.

	Df	Var	F	N.Perm	Pr(>F)
RDA1	1	0.57990	165.684	999	0.001 ***
RDA2	1	0.24697	70.563	999	0.001 ***
RDA3	1	0.07020	20.057	999	0.131
RDA4	1	0.06425	18.356	999	0.127
Residual	83	290.506			

Anexo 1.4. Variância dos componentes da análise de redundância discriminante das espécies de *Actinote* em função da distribuição dos quatro gêneros de plantas hospedeiras e das características ambientais de cada sítio. (Df) graus de liberdade; (Var) variância; (N.Perm) número de permutações.

	Df	Var	F	N.Perm	Pr(>F)
RDA1	1	169.88	90.015	999	0.001 ***
RDA2	1	23.75	12.584	999	0.266
RDA3	1	16.35	0.8663	999	0.396
Residual	19	358.57			

Anexo 1.5. Resultados do modelo misto generalizado do efeito da densidade das plantas nos padrões de oviposição das espécies de *Actinote*.

	Estimate	Std.Error	z value	Pr(> z)
<i>A. melanisans</i>				
(Intercept)	-2.372e+00	5.699e-01	-4.162	3.16e-05 ***
plantaAustro:dens	-2.741e+02	4.765e+02	-0.575	0.565106
plantaChromo:dens	-9.475e+01	9.987e+01	-0.949	0.342759
plantaMikania:dens	7.155e+01	1.858e+01	3.850	0.000118 ***
plantaVernona:dens	-7.564e+03	3.295e+06	-0.002	0.998169
<i>A. carycina</i>				
(Intercept)	-2.022e+00	4.521e-01	-4.473	7.70e-06 ***
plantaAustro:dens	2.591e+01	5.852e+00	4.427	9.56e-06 ***
plantaChromo:dens	-7.589e+03	7.494e+06	-0.001	0.999
plantaMikania:dens	-2.708e+04	1.142e+07	-0.002	0.998
plantaVernona:dens	-4.120e+01	6.673e+01	-0.617	0.537
<i>A. pellenea</i>				
(Intercept)	-2.956e+00	8.803e-01	-3.357	0.000787 ***
plantaAustro:dens	4.586e+01	1.088e+01	4.216	2.49e-05 ***
plantaChromo:dens	-6.862e+03	2.186e+06	-0.003	0.997495
plantaMikania:dens	-5.701e+02	8.376e+02	-0.681	0.496108
plantaVernona:dens	-7.759e+03	8.332e+05	-0.009	0.992570
<i>A. pyrroha</i>				
(Intercept)	-1.1731	0.3527	-3.326	0.000881 ***
plantaAustro:dens	13.4968	6.6742	2.022	0.043151 *
plantaChromo:dens	44.7631	10.2687	4.359	1.31e-05 ***
plantaMikania:dens	-0.6580	20.1825	-0.033	0.973990
plantaVernona:dens	28.1375	8.8454	3.181	0.001468 **

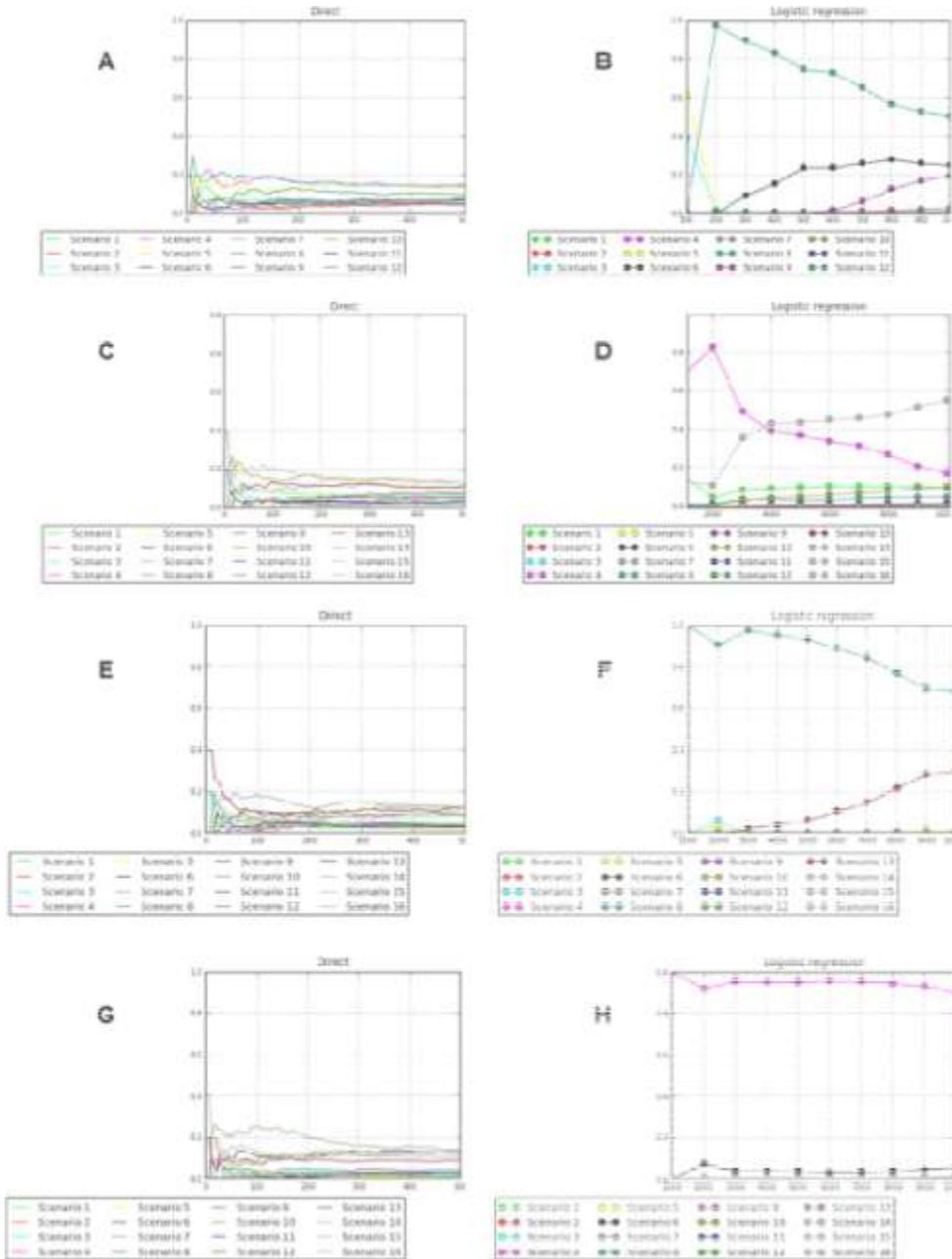
Anexo 1.6. Modelos mistos lineares generalizados. Padrão de oviposição em função da co-ocorrência de grupos de ovos ou de larvas (fator fixo), em cada sítio e na mesma planta. Os menores índices dos critérios de informação bayesiana (BIC) foram usados para escolha do melhor modelo. (EP) erro padrão

	Fixed	Cluster	BIC	Estimate	EP	z value	Pr(> z)	
<i>A. melanisans</i>	(Intercept)	planta	79.96*	-1.5691	0.3542	-4.430	9.41e-06 *	
	pellenea			-15.4682	2584.702	-0.006	0.995	
	carycina			-16.3166	4832.935	-0.003	0.997	
	pyrrha			-0.1589	0.2195	-0.724	0.469	
	(Intercept)	planta:sítio	82.72	-3.41099	0.66760	-0.002	3.23e-07 *	
	pellenea			-15.4682	7591.573	5.109	0.998	
	carycina			-16.3166	9871.683	-0.002	0.999	
	pyrrha			0.02145	0.26978	0.080	0.937	
	<i>A. carycina</i>	(Intercept)	sítio	84.94	-3,0954	0,7301	-4.239	2.24e-05 *
		melanisans			-15,5073	1953,431	-0,008	0,993666
pellenea				0,6463	0,1925	3,357	0.000787 *	
pyrrha				0,2477	0,2635	0,94	0,347261	
(Intercept)		planta:sítio	73.17*	-4,3513	0,9026	-4,821	1.43e-06 *	
melanisans				-15,5073	9314,411	-0,002	0,999	
pellenea				0,4246	0,307	1,383	0,167	
pyrrha				0,2188	0,412	0,531	0,595	
<i>A. pellenea</i>		(Intercept)	sítio	115.6	-2.3025	0.6074	-3.791	0.00015 *
		melanisans			-15.4214	2984.956	-0.005	0.99588
	carycina			1.0969	0.2596	4.225	2.39e-05 *	
	pyrrha			-0.3261	0.4008	-0.814	0.41590	
	(Intercept)	planta:sítio	80.34*	-5.1204	1.2076	-4.240	2.24e-05 *	
	melanisans			-15.4214	13451.69	-0.001	0.999	
	carycina			0.3369	0.6088	0.553	0.580	
	pyrrha			-0.2176	1.0274	-0.212	0.832	
	<i>A. pyrrha</i>	(Intercept)	sítio	161.6	-0.86695	0.39976	-2.169	0.0301 *
		melanisans			-0.18093	0.18936	-0.956	0.3393
carycina				0.37961	0.28374	1.338	0.1809	
pellenea				-0.06133	0.23384	-0.262	0.7931	
(Intercept)		planta:sítio	154.4*	-0.90323	0.24689	-3.658	0.000254 *	
melanisans				0.04747	0.22917	0.207	0.835918	
carycina				0.17910	0.30699	0.583	0.559630	
pellenea				-0.12152	0.24301	-0.500	0.617030	

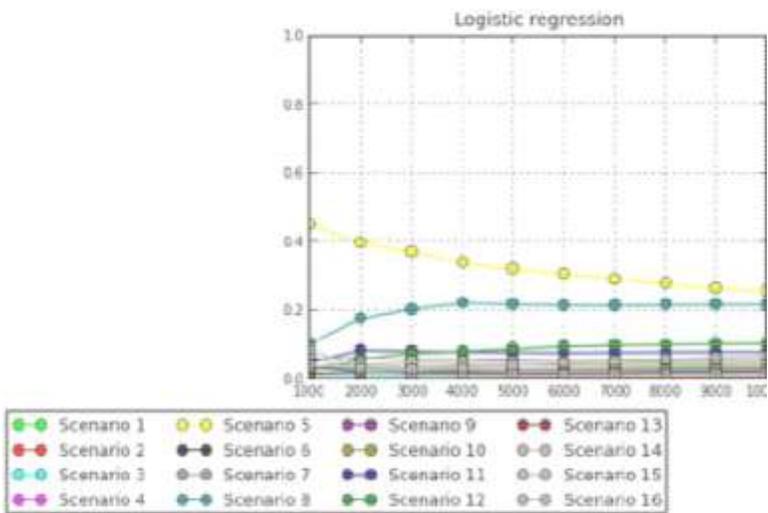
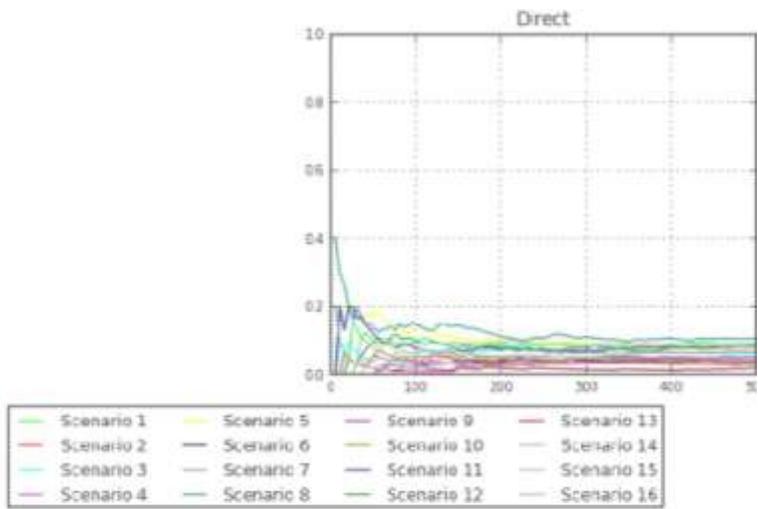
Anexo 2.1. Parâmetros estatísticos utilizados para a estimativas de probabilidade de ocorrência dos cenários testados nas análises computacionais bayesiana (ABC).

Parâmetro	
Intra populacional	Número de haplótipos
	Número de sítios segregados
	Variância das diferenças pareadas Tajima D
	Sítios segregados privados
	Número médio de nucleotídeos raros
	Variância do Número médio de nucleotídeos raros
	Inter populacional
Média das diferenças pareadas dentro das populações	
Média das diferenças pareadas entre populações	
FST (Hudson <i>et al.</i> 1992)	

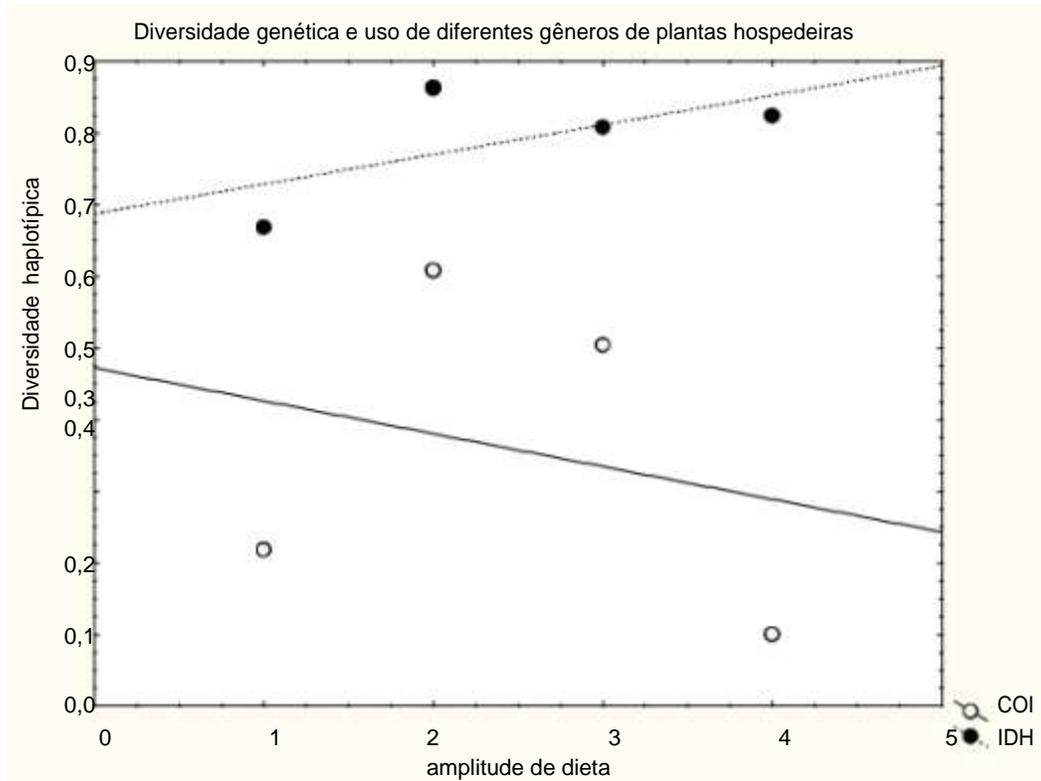
Anexo 2.2. Comparação das probabilidades posteriores de cada um dos cenários testados na simulação e seleção de modelos históricos das populações (regiões) das quatro espécies de *Actinote* estudadas, utilizando dois métodos estatísticos: direto (esquerda) e regressão logística (direita). (A e B) *A. melanisans*, (C e D) *A. carycina*, (E e F) *A. pellenea*, (G e H) *A. pyrrrha*. As cores indicam os cenários conforme indicados na legenda de cada gráfico.

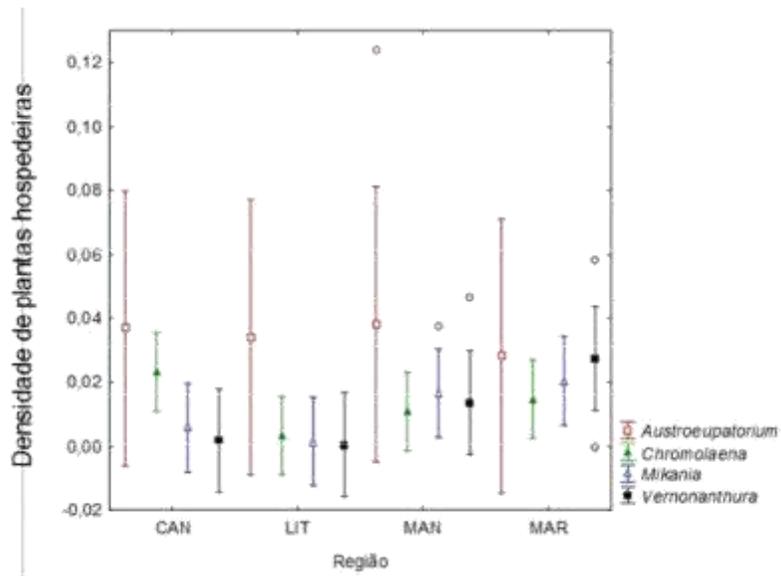


Anexo 2.3. Comparação das probabilidades posteriores de cada um dos cenários testados na simulação e seleção de modelos históricos das linhagens de *A. pyrrha* encontradas nos quatro gêneros de plantas hospedeiras estudadas, utilizando dois métodos estatísticos: direto (esquerda) e regressão logística (direita).



Anexo 2.4. Correlação entre diversidade de haplótipos e amplitude de dieta (número de gêneros de plantas hospedeiras) nas quatro espécies de Actinote estudadas. Foram utilizados dados do gene mitocondrial (COI) e do gene nuclear isocitrato dehidrogenase (IDH). Ambas as correlações não foram significativas.





Anexo 2.5. Média e desvio padrão da densidade de cada um dos quatro gêneros de plantas hospedeiras em quatro diferentes regiões. Serra da Canastra (CAN), Litoral, (LIT), Serra da Mantiqueira (MAN) e Serra do Mar (MAR). Os círculos abertos representam os “outliers”

Anexo 3.1. Probabilidade de agrupamento genético em cada uma das populações amostradas, entre maio e dezembro de 2013. Araxá, MG (ARA), Caxambu, MG (CAX), São Lourenço, MG (HEL), Pouso Alto, MG (ALT), Passa Quatro, MG (QUA), Goiabal, SP (GOI), Silveiras, SP (SIL).

Sítio	Cluster1	Cluster2	Cluster3
ALT	0.8574	0	0.14286
ARA	0.38095	0.2857	0.33
CAX	0.04762	0.38095	0.57143
GOI	0.14286	0.61905	0.23810
HEL	0.42857	0.19048	0.38095
QUA	0.80952	0.00000	0.19048
SIL	0.33000	0.38095	0.28571

Anexo 3.2. Probabilidade de preferência de oviposição de *A. pyrrha* nos quatro gêneros de plantas amostrados, entre maio e dezembro de 2013. Araxá, MG (ARA), Caxambu, MG (CAX), São Lourenço, MG (HEL), Pouso Alto, MG (ALT), Passa Quatro, MG (QUA), Goiabal, SP (GOI), Silveiras, SP (SIL).

Sítio	<i>Austroepatorium</i>	<i>Chromolaena</i>	<i>Mikania</i>	<i>Vernonanthura</i>
ALT	0,1653798	0,2746146	0,0417013	0,4629507
ARA	0,69393721	0,18451752	0,03353671	0,09652978
CAX	0,1150727	0,3991296	0,123694	0,2898172
GOI	0,1662271	0,1174685	0,163823	0,4804538
HEL	0,16862233	0,61283	0,02510407	0,13907263
QUA	0,1728734	0,3234709	0,1820754	0,2446899
SIL	0,05034534	0,46666642	0,20456138	0,2342235