UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Estruturação genética de *Junonia evarete* (Lepidoptera: Nymphalidae) no sul do Brasil

Carolina Prediger

Pelotas, 2017

Carolina Prediger

Estruturação genética de *Junonia evarete* (Lepidoptera: Nymphalidae) no sul do Brasil

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª. Drª. Juliana Cordeiro

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P922e Prediger, Carolina

Estruturação genética de Junonia evarete (Lepidoptera: nymphalidae) no sul do Brasil / Carolina Prediger ; Juliana Cordeiro, orientadora ; Cristiano Agra Iserhard, coorientador. — Pelotas, 2017.

36 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Coi. 2. Estruturação populacional. 3. Fluxo gênico. 4. Genética de populações. 5. Migração. I. Cordeiro, Juliana, orient. II. Iserhard, Cristiano Agra, coorient. III. Título.

CDD : 595.78

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Dedico esse trabalho a minha mãe, Vera.

Agradecimentos

Ao meu pai, Reneu e à minha mãe, Vera, que não só me deram a oportunidade de que eu concluísse a graduação, mas também me impulsionaram para que eu a conquistasse. Me incentivaram a ter novas experiências e me apoiaram quando tudo parecia estar perdido. Também aos meus irmãos Ricardo e Vanessa que tiveram que me ouvir falando sem parar sobre coisas estranhas que eu aprendia nesses anos de graduação. Amo vocês.

Aos professores que tive ao longo de minha vida de estudante, muito obrigada por terem me ensinado o caminho da biblioteca.

Aos colegas da UFPel pela companhia nas diversas disciplinas que cursamos juntos, vocês me ensinaram mais do que imaginam.

Aos amigos que fiz em terras distantes, em especial à Guilherme e Denise, muito obrigada por me ensinar que a vida não precisa ser vivida inteiramente dentro da biblioteca.

À minhas colegas de república, Ângela, Maquele, Gabi, Dauana, Elma e Domi obrigada pelos bolos, cafés, festas de aniversário e principalmente pelas conversas sobre a vida, o universo, os seriados e o sistema. Valeu meninas, deixo para vocês a missão de escolher o nome da república.

A minha primeira orientadora, lá da Universidade Federal de Rondônia, Rubi, que me acolheu no laboratório Dr. Bernardo Beiguelman quando estava no primeiro semestre, ela fez muito mais do que me ensinar o que é uma DNA polimerase, ela me mostrou que o estágio poderia ser divertido. Valeu!

Aos meus colegas do laboratório Dr. Bernardo Beiguelman, Daniele, Marla, Allison, Najila, Natanael, Horton, Sergio e Carina - vocês fizerem os meus dias mais alegres.

Aos meus colegas da turma BIOUNIR2010, em especial a Suelen, Paulo, Bruno, Willene, Marcel, Mari e Jenifer pelas noites de corujão estudando bioquímica

e comendo brigadeiro, pelas conversas na cantina, pelos momentos de “escadinha da verdade”, pelos ouvidos e ombros, muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório DIVERGE Taís, Mari, Tuka, João, Dani e Nath por terem me mostrado o significado de ser um verdadeiro lagarto. Valeu!

Ao meu Coorientador, Cris, por ter confiado em mim para realizar esse projeto e por não ter me expulsado dele devido as minhas crises existenciais.

Por fim agradeço a minha orientadora, professora Juliana Cordeiro, por ter me dado vaga em uma das banquetas do DIVERGE, por me ensinado absolutamente tudo necessário para que esse trabalho de conclusão de curso acontecesse, por ter me ensinado que as vezes é melhor dar uma volta, e que é importante colocar meus arquivos no “C:/” antes de começar a “rodar” os dados. Valeu Ju, vou sentir muita saudade!

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais
retornará ao seu estado original
Albert Einstein

Resumo

PREDIGER, Carolina. **Estruturação genética de Junonia evarete (Lepidoptera: Nymphalidae) no sul do Brasil**. 2017. 36f. Trabalho de conclusão de curso – curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Junonia evarete (Lepidoptera: Nymphalidae) é uma borboleta comumente encontrada no Rio Grande do Sul nas estações de primavera-verão. Essa espécie é conhecida pelo padrão de disposição dos seus ocelos, sendo este o motivo pelo seu nome popular *buckeyes*. Sabe-se que essa espécie apresenta comportamento migratório; logo, é possível que esse comportamento leve a homogeneização de suas populações. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a estruturação genética de populações de *J. evarete* do Rio Grande do Sul. Para alcançar esse objetivo, o DNA de indivíduos de sete populações do Rio Grande do Sul foi extraído, um fragmento do gene citocromo oxidase subunidade I foi amplificado, purificado e sequenciado. Sequências *in silico* foram buscadas no banco de dados do projeto *Barcode of life* e analisadas para comparar com a população do RS. A diversidade haplotípica e nucleotídica, e o teste D de Tajima foram calculados para cada população. A rede de haplótipos foi construída utilizando o método de Median-Joining. O índice divergência genética entre populações (F_{ST}) e o teste de Mantel foram calculados. A diversidade haplotípica e a nucleotídica de toda a população foi 62,9 % e 0,25%, respectivamente. O teste D de Tajima apresentou valores negativos mas não significativos para nenhuma das populações. A configuração da rede de haplótipos foi do tipo estrela, dando destaque para um haplótipo compartilhado por vinte e dois indivíduos de todas as localidades. O resultado de F_{ST} foi próximo a zero para a grande maioria das populações do Rio Grande do Sul. O teste de Mantel mostra a falta de correlação entre diversidade genética e distância geográfica (r=0,082). A população mais semelhante com o Rio Grande do Sul foi da Argentina. Esses resultados levam a conclusão de que as populações de *J. evarete* do Rio Grande do Sul apresentam uma diversidade genética baixa e não apresentam estruturação genética.

Palavras chave: COI; estruturação populacional; fluxo gênico; genética de populações; migração.

Abstract

PREDIGER, Carolina. **Genetic structure of *Junonia evarete* from South of Brazil**. 2017. 36f. Trabalho de conclusão de curso – curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Junonia evarete (Lepidoptera: Nymphalidae) is ordinarily found in South of Brazil during spring-summer season. This species is known by its ocelli disposition, that is the reason for its common name, buckeyes butterfly. *J. everete* presents migratory behaviour, therefore, its populations may be homogenised due gene flow. The present study aims to analyse the genetic structure of *J. evarete* from seven populations of Rio Grande do Sul. In order to accomplish this, the DNA was extracted from individual from seven population from south of Brazil. A fragment of cytochrome oxidase subunit I gene was amplified, purified and sequenced. Sequences of *Junonia* were searched from Barcode of life database. Theses sequences were used to compare with the sequences from the south of Brazil. The haplotyde diversity, nucleotide diversity and Tajima's D test were calculated for each population. A haplotyde network was built using median-joining's method. The fixation index (F_{ST}) and the Mantel's test were calculated. Haplotyde diversity and nucleotide diversity were 62,9% and 0,25%, respectively. Tajima's D test value was negative but not significant. The haplotyde network configuration was star-like. One haplotype was highlighted comparing with others, because it was shared by twenty two individuals, from all populations. The F_{ST} values were close to zero for most of the populations. Mantel's test showed no correlation between genetic diversity and geographical distance (r=0,082). Argentina´s population and the population analyzed here are very similar. These findings show that the South of Brazil populations of *J. everete* have low genetic diversity and that these populations have no genetic structure.

Key words: COI; gene flow; migration; population genetics; population structure.

Sumário

1. Introdução 9
2. Revisão de Literatura 12
2.1. Migração em insetos 12
2.2. O gênero *Junonia* 13
3. Metodologia 17
3.1. Extração de DNA 17
3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento das amostras 17
3.3. Bioinformática e análise dos dados 18
4. Resultados 19
5. Discussão 25
6. Considerações finais 27
Referências 28

1. Introdução

A estrutura genética de uma população pode ser definida como a disposição não aleatória dos alelos no espaço e no tempo. A ação conjunta de mutação, migração, seleção natural, deriva genética, geografia, biologia e história de vida da espécie resulta na estrutura genética de suas populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Outro processo que pode influenciar a estruturação genética de populações é a localização das populações com relação a distribuição geográfica da espécie. Segundo a teoria do “centro mais abundante”, as populações localizadas no centro da amplitude geográfica da espécie são mais abundantes enquanto que as espécies na borda da distribuição são menores e mais isoladas. Além disso, populações da margem são propensas a maiores variações demográficas (VUCETICH; WAITE, 2003; ECKERT; SAMIS; LOUGHEED, 2008). Desta forma, visualiza-se nas populações geograficamente centrais maior diversidade genética, e menor diferenciação genética entre as populações, além do efeito fundador e gargalo genético serem menos comuns nessas populações (ECKERT; SAMIS; LOUGHEED, 2008).

A migração, ocorre em muitos táxons por diferentes motivos. Independentemente disto, este processo causa alterações nas populações daquela espécie, em geral levando a homogeneização genética destas populações (FREEMAN; HERRON, 2009). Os processos migratórios em insetos são difíceis de serem estudados utilizando-se métodos tradicionais, como marcação com fluorescência, isótopos radioativos ou monitoramento por radar, devido ao seu pequeno tamanho corporal e ao curto ciclo de vida (CHAPMAN; DRAKE; REYNOLDS, 2011). Contudo, compreender os mecanismos por trás da migração pode esclarecer os processos evolutivos de tais táxons. Desta forma, a alternativa existente aos métodos tradicionais são as metodologias empregadas por técnicas de genética de populações (WEI et al., 2013).

Com o objetivo de testar as teorias que relacionam o efeito da migração na diversidade genética, tem-se utilizado mais comumente espécies que possuem

comportamento migratório conhecido devido aos estudos clássicos; como por exemplo, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae), popularmente conhecida como monarca (PFEILER; MARKOW, 2017). Além da monarca, são poucas as espécies cujo comportamento migratório é bem conhecido; contudo, foram registrados eventos de migração em massa de espécies do gênero *Junonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) na Argentina (WILLIAMS, 1930 apud BORCHES; MARCUS, 2014) e no Rio Grande do Sul (ISERHARD, comunicação pessoal). Além disso, considerando que há registro de hibridização no gênero (HAFERNIK, 1982), é possível que os eventos migratórios sejam um dos fatores promotores dos eventos de hibridização, promovendo introgressão entre as espécies.

O gênero *Junonia*, amplamente distribuído no continente americano possui uma problemática, visto a existência de um complexo de espécies. O complexo *Junonia evarete* foi proposto por Pelham (2008), e seria composto por *J. evarete* Cramer, 1779*, J. genoveva* Cramer, 1780 e *J. coenia* Hübner, 1822, sendo que na América do Sul há registro de ocorrência de *J. evarete* e *J. genoveva*. A grande maioria dos estudos busca esclarecer as relações filogenéticas entre as potenciais espécies que ocorrem no continente americano, por meio de marcadores morfológicos, comportamentais (BRÉVIGNON; BRÉVIGNON, 2012) e moleculares, sendo explorada, principalmente, a técnica de *DNA Barcode* (BRÉVIGNON; BRÉVIGNON, 2012; PFEILER et al., 2012; BORCHERS; MARCUS, 2014, GEMMELL; BORCHERS; MARCUS, 2014). Estudos com biologia molecular mostram que ao utilizar fragmentos do gene *citocromo oxidase subunidade I* (COI) há formação de dois grandes clados, que de forma geral, separam os indivíduos da América do Norte e do Sul (BRÉVIGNON; BRÉVIGNON, 2012; PFEILER et al., 2012; GEMMELL; BORCHERS; MARCUS, 2014). Contudo, um dos últimos trabalhos realizados com este gene agrupa alguns indivíduos coletados em Buenos Aires (Argentina) no clado da América do Norte (BORCHERS; MARCUS, 2014). Sabe-se que populações do gênero se estabeleceram nas Américas entre 4 a 2 milhões de anos (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007) e que os dois clados se divergiram a aproximadamente 2 milhões de anos (PFEILER; JOHNSON; MARKOW, 2012). Possíveis espécies presentes nesses clados tiveram especiação posterior a dois milhões de anos, sendo essa

especiação recente um dos possíveis motivos para a técnica *DNA Barcode* não ser eficiente nesse táxon.

Baseado nas informações acerca do gênero *Junonia*, é possível que a frequente migração neste grupo leva à ausência de estruturação genética entre as populações de *Junonia evarete*, sendo então constantemente homogeneizadas. Considerando essa hipótese, é possível que apenas variantes morfológicas sejam encontrados ao longo da distribuição da espécie. O objetivo geral deste trabalho é verificar presença/ausência de estruturação genética nas populações do Rio Grande do Sul. Os objetivos específicos são: (i) Verificar o número de populações no rio Grande do Sul. (ii) Caracterizar a variabilidade genética de cada uma das populações estudadas utilizando o marcador molecular citocromo oxidase subunidade 1; (iii) comparar as populações do Rio Grande do Sul com populações estudadas previamente.

2. Revisão de Literatura

2.1. Migração em insetos

Diversas condições ambientais levam o conjunto de indivíduos de uma população a se deslocarem geograficamente através de amplas distâncias. O efeito geral da migração é a homogeneização das frequências alélicas nas populações que se deslocam. Em populações com altas taxas de migração, é possível que as frequências alélicas se igualem quando não há atuação de nenhuma outra força evolutiva (FREEMAN; HERRON, 2009).

O estudo dos efeitos da migração na estruturação genética de populações de invertebrados normalmente é realizado com espécies que apresentam um padrão de migração bem conhecido (WEI et al., 2013). De acordo com Pfeiler e Markow (2017), para estes organismos há três padrões para a relação da diversidade haplotípica e estrutura filogeográfica: (a) baixa diversidade haplotípica sem correlação com estrutura filogeográfica; (b) alta diversidade haplotípica associada a estrutura filogeográfica e (c) alta diversidade haplotípica sem associação com a estrutura filogeográfica.

O trabalho de Freeland et al. (2003) estudou as libélulas *Anax junius* (Drury, 1773) (Odonata: Aeshnidae) encontradas na América do Norte e Central. Essa espécie migra em direção ao norte na primavera e para o sul no outono, sendo que nem todas as populações migram. Os autores verificaram um padrão de alta diversidade haplotípica sem associação com a estrutura filogeográfica. Eles também identificaram que populações não migrantes compartilham haplótipos com indivíduos migrantes, destacando a homogeneização destas.

Pantala flavescens (Fabricius, 1798) *(*Odonata: Libellulidae) foi amplamente estudada (Troast et al. 2016; Low et al. 2017) e recentemente Pfeiler e Markow (2017) reanalisaram os dados disponíveis do fragmento de COI encontrando alta diversidade haplotípica sem associação com a estrutura filogeográfica. Dessa forma, os autores concluem que alto fluxo gênico e não resulta na diminuição/redução da diversidade genética entre as populações.

Algumas espécies migratórias de Lepidoptera apresentam suas rotas migratórias bem conhecidas devido a estudos clássicos. Comumente, testa-se hipóteses relacionadas com o efeito da migração sobre suas populações. Pode-se citar, como exemplo, *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), popularmente conhecida como monarca, e *Vanessa cardui* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Nymphalidae), conhecida como bela-dama.

Pfeiler et al. (2017) realizou estudos com populações migratórias e não migratórias de monarca, seus resultados para o fragmento do gene COI mostram baixa diversidade haplotípica e nucleotídica, sendo encontrado apenas seis haplótipos. Contudo, esses autores encontraram estruturação genética entre as populações com hábitos migratórios e não migratórios.

O estudo de Pfeiler e Markow (2017) com *V. cardui* da América do Norte, Europa e Australásia, mostraram baixa diversidade genética e verificaram a existência de apenas sete haplótipos, sendo dois deles predominantes. Os autores notaram que nenhum indivíduo da América do Norte compartilhava tais haplótipos predominantes, e indicam que isso se deve a uma diferenciação na rota de migração em escala mundial. Os autores concluem que o padrão encontrado é baixa diversidade haplotípica e ausência de estruturação filogeográfica. Ao analisar os efeitos da migração em insetos de diferentes táxons, Pfeiler e Markow (2017) verificaram que o marcador COI apresenta potencial para identificar migração de populações, mesmo quando a diversidade das sequências é baixa.

2.2. O gênero *Junonia*

Uma característica marcante da tribo Junoniini são ocelos presentes nas asas, os quais na superfície dorsal normalmente apresentam maior variação entre as espécies em relação aos da face ventral. Contudo, o número e a posição desses ocelos são idêntico em muitas espécies e pode estar ausente/reduzido em algumas delas (KODANDARAMAIAH, 2009) (Figura 1). Atualmente, Junoniini é formada por seis gêneros: *Presis*, *Hypolimnas*, *Salamis, Yoma, Protogoniomorpha* e *Junonia*.

Figura 1 - Ocelos marcantes de *J. evarete* encontrados tanto em vista ventral (esquerda) quanto em vista dorsal (direita). Fonte: Base de dados LELep

Junonia é um gênero bastante utilizado em estudos de desenvolvimento e evolução de ocelos (KODANDARAMAIAH, 2009), padrão de coloração das asas (MONTEIRO; PRUDIC, 2010) e evolução de preferências alimentares (BOWERS; STAMP, 1997). Há muito debate entre o número de espécies que constitui o gênero, sendo normalmente considerado entre 30 e 35 espécies (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007). *Junonia* é distribuída em todas as regiões biogeográficas com exceção da Antártida, sendo principalmente encontrada nos trópicos. Sua origem e diversificação foi estudada por Kodandaramaiah e Wahlberg (2007), indicando que o continente americano foi colonizado pelo gênero há aproximadamente 2,3 a 4,2 milhões de anos atrás, um período relativamente recente. Os autores também sugerem que ocorreu uma especiação rápida entre as espécies americanas.

Segundo Borches e Marcus (2015), há nove espécies do gênero no continente americano sendo elas: *Junonia coenia* Hübner, 1822; *J. divaricata* C. & R. Felder, 1867; *J. evarete* Cramer, 1779; *J. litoralis* Brévignon, 2009; *J. neildi*, Brévignon, 2004; *J. genoveva* Cramer, 1780; *J. wahlbergi* Brévignon, 2008; *J. vestina* C. & R. Felder, 1867 e *J. zonalis* C. & R. Felder, 1867. De acordo com Pelham (2008), há um complexo de espécies chamado “complexo *Junonia evarete*” constituído por *J. evarete, J. genoveva* e *J. coenia*.

Apesar de diferenças morfológicas e comportamentais entre as espécies que compõe o complexo *Junonia evarete* estarem descritas na literatura [diferenças no padrão de coloração, proporção dos ocelos, tamanho do adulto, número de espinho por

valva e habito alimentar (TURNER; PARNELL, 1985)] a veracidade dessas espécies tem sido questionada devido a uma alta variabilidade intraespecífica no padrão de coloração e maculação das asas. Por este motivo, pesquisadores foram motivados a esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero e/ou identificar espécies por meio de técnicas de biologia molecular.

O primeiro trabalho utilizando biologia molecular tendo com produto as relações filogenéticas do gênero utilizou um gene *COI* e dois genes nucleares (wingless e fator de alongamento α-1). Oito espécimes do continente americano foram utilizados nesse trabalho, pertencentes às três espécies americanas componentes do "complexo *J. evarete*". (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007). Porém, os resultados para o continente americano não foram conclusivos devido ao baixo número amostral. Outros autores buscaram testar o método DNA *barcode* para as espécies de *Junonia* no continente americano (PFEILER; JOHNSON; MARKOW, 2012). A análise filogenética mostrou a presença de dois grandes clados (clado A e clado B). O clado A agrupou os espécimes da América do Sul e Caribe. As espécies desse clado haviam sido identificadas como *J. vestina, J. evarete* e *J. genoveva*. O clado B agrupou os espécimes da América do Norte, Costa Rica, México e Panamá. Os espécimes desse clado são identificados como *J. genoveva*, *J. coenia*, *J. evarete*. Dessa forma os autores concluíram que a técnica DNA *barcode* não é eficaz para a identificação de espécies de *Junonia* distribuídas no continente americano. Esses autores também estimaram que a ramificação desses dois clados ocorreu a aproximadamente dois milhões de anos.

Gemmell, Borchers e Marcus (2014) buscaram analisar novos marcadores moleculares que pudessem auxiliar na separação das espécies. Eles analisaram a estrutura genética de *Junonia* da Guiana Francesa, Guadalupe e Martinique e Argentina utilizando os marcadores COI, *wingless* e regiões não específicas por meio da metodologia *Randomly amplified fingerprints* (*RAF*). Quanto ao fragmento de COI os resultados foram semelhantes ao de Pfeiler, Johnson e Markow, (2012), verificando-se a existência de dois grandes clados, mas esses haplótipos não correspondem a separação morfológica de espécies. O gene *wingless* apresentou resolução no nível geográfico, mas não foi suficiente para separar espécies; e o

método *RAF* resultou na separação de 11 populações divididas em três grandes grupos.

Posteriormente, Borchers e Marcus (2014) utilizaram metodologia semelhante, buscando averiguar se as duas formas de *Junonia* ocorrentes na Argentina são espécies diferentes ou se as variações morfológicas eram intraespecíficas. As análises com o gene *COI* mostraram duas linhagens que divergem 4%, mas não correspondem as duas formas estudadas (separando indivíduos nos dois grandes clados). O gene nuclear *wingless* apresentou diferença significativa quanto a estrutura genética dos dois morfotipos analisados. Os autores também utilizaram a metodologia *RAF,* e esse método distinguiu três grupos de *Junonia.*

3. Metodologia

3.1. Extração de DNA

Foram analisados indivíduos de *J. evarete* coletados por colaboradores do Laboratório de Ecologia de Lepidoptera (LELep) da Universidade Federal de Pelotas e do Laboratório de Ecologia de Insetos (LEI) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os espécimes foram coletados entre dezembro de 2013 e abril de 2014, em oito municípios da Região Sul, formando sete populações analisadas (Tabela 1). Os espécimes foram identificados, montados e depositados na coleção de referência do LELep. Duas pernas de cada indivíduo foram armazenadas a -20ºC para a extração de DNA. O DNA total de cada indivíduo foi extraído utilizando o *DNeasy® Blood and Tissue kit* (*QIAGEN*) segundo as recomendações do fabricante.

Tabela 1 - Municípios amostrados, suas siglas utilizadas ao longo do texto e as coordenadas geográficas dos indivíduos de *J. evarete* coletados entre dezembro de 2013 e abril de 2014 no Rio Grande do Sul.

População	Município	Coordenadas Geográficas
AL	Alegrete	29º46'59"S 55º47'31"O
DP	Dom Pedrito	30º58'58"S 54º40'23"O
PM	Palmeira das Missões	27º53'58"S 53º18'49"O
PC	Pelotas	31º46'19"S 52º20'33"O
SM	Santa Maria	29º41'03"S 53º48'25"O
SL	Santana do Livramento	30º53'27"S 55º31'58"O
EL	Eldorado do Sul	30º05'02"S 51º36'58"O

3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento das amostras

O fragmento do gene mitocondrial COI foi amplificado utilizando o *primer forward* universal LCO1490 (FOLMER et al., 1994) e o *primer reverse* Nancy 2191 (SIMON et al., 1994) que geram fragmentos de 700 pares de bases. Os fragmentos foram amplificados por PCR que tiveram volume final da reação de 10µl, com concentração de: 25 ng de DNA, 0,5 µM de cada primer, 1 mM de dNTP, 1 mM de $MgCl_2$ e tampão 1x e 1,25 unidades *GoTaq® Hot Start Polymerase*. A variação de temperatura se deu da seguinte forma: 94ºC por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a

94ºC por 45 segundos, temperatura de anelamento 56ºC por 45 segundos, 72ºC por 45 segundos. Posterior a repetição dos ciclos, foi acrescentado 3 minutos a 72°C.

Os amplicons gerados foram purificadas utilizando o kit *QIAquick® PCR purification kit* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, amostras de 20ng do produto de cada PCR foram enviados à empresa Macrogen para sequenciamento de ambas as fitas (*forward* e *reverse*) pelo método de Sanger.

3.3. Bioinformática e análise dos dados

As sequências consenso das leituras *forward* e *reverse* de cada indivíduo foram montadas utilizando o software *Staden Package* (STADEN, 1996). Posteriormente, as sequências foram alinhadas de acordo com o algoritmo ClustalW utilizando o programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Sequências *in silico* pertencentes ao *Barcode Index Number* (BIN) BOLD:AAA5788 (clado de indivíduos predominantemente da América do Sul) foram adquiridas no banco de dados do *Barcode of Life Database* (http://www.boldsystems.org/) e separadas por populações baseada no país de procedência. Foi realizado busca por numts utilizando o método proposto por Robe et al. (2012), e as sequências que apresentarem evidências de ser numts não foram utilizadas nas análises seguintes.

Utilizando o programa DNAsp5 (LIBRADO; ROZAS, 2009), foram calculados os índices de diversidade genética [número de haplótipos (h), número de sítios polimórficos (s), diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd), número de diferença nucleotídica (k)] para cada população que apresentou cinco ou mais indivíduos. O teste de neutralidade D de Tajima foi calculado no programa DNAsp5 para cada população que apresentou cinco sequências ou mais (Tajima, 1989).

A rede de haplótipos foi construída pelo método de median-joining para dados de sequências mitocondriais no programa Network 4.5.1.0 (BANDELT et al., 1999), utilizando somente as sequências do Rio Grande do Sul (RS) e combinando estas sequências com as encontradas no banco de dados. O índice de divergência genética entre populações (F_{ST}) foi calculado utilizando os programas DNAsp5 e Arlequin 3.5.2.2. (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O teste de Mantel foi realizado no programa Alleles in Space para as sequências do RS (MILLER, 2005).

4. Resultados

Foram produzidas 36 sequências do fragmento COI de indivíduos do RS e 139 sequências provenientes das buscas *in silico* no banco de dados BOLD. As sequências deste trabalho apresentam 679 sítios nucleotídicos no total, sendo 637 sítios comuns a todas as sequências. Das 36 sequências geradas, uma sequência pertence a população AL, três a DP, oito a EL, sete da PC, oito da PM, sete da SL e duas da SM. As regiões com dados faltantes (*missing data*) foram desprezadas nas análises de diversidade genética. Os resultados de busca por numts mostram que todas as sequências de COI geradas e as *in silico* não apresentam códon de parada. As análises da comparação de mutações sinônimas por sítios sinônimos (dS) e mutações não sinônimas por sítios não sinônimos (dN) e o teste Z de neutralidade indicam que todas as sequências estão passando por seleção purificadora. Com relação as sequência geradas, observou-se apenas uma mutação não sinônima onde o amino ácido normalmente foi encontrado era uma glicina (GGA) e foi substituído por uma serina (AGA). Logo, todas as sequências foram utilizadas nas análises seguintes.

A Tabela 2 apresenta, para cada população mais de quatro indivíduos, os índices de diversidade (número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h) diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (K) e o resultado do teste de neutralidade D de Tajima). Para populações com menos de 4 indivíduos ver apêndice A. Considerando as populações do RS, destacam-se os altos valores de diversidade encontrado na população SL (Hd=95,2%; π=0,49%) e a baixa diversidade de EL (Hd=25,0%; π=0,04%). A diversidade haplotípica e nucleotídica do conjunto de populações do RS foi Hd=62,9% e π=0,25%. Considerando as populações com sequências adquiridas *in silico*, destacam a alta diversidade haplotípica e nucleotídica encontrados para o Panamá, Brasil e Peru (Hd= 94,4; 93,3; 90,5%; π= 0,57; 0,88; 0,62%, respectivamente); e a baixa diversidade encontrada para as sequências de indivíduos provenientes da Jamaica (Hd=42,9%; π= 0,06%).

Tabela 2 - Índices de diversidade das populações com pelo menos cinco indivíduos de *Junonia* do Rio Grande do Sul (RS) e das populações adquiridas *in silico* no banco de dados BOLD.

População	N	S	H	Hd (%)	π (%)	K	Teste D de Tajima
SL	7	10	6	95,2	0,49	3,33	-0,98 (p > 0,1)
PM	8	8	5	78,6	0,36	2,46	-0,97 (p > 0,1)
PC	7	4	4	71,4	0,17	1,14	-1,43 (p > 0,1)
EL	8	1	2	25	0,04	0,25	-1,05 (p > 0,1)
RS	36	17	12	62,9	0,25	1,58	-2,03 (p>0,05)
RS + Brasil*	42	23	17	72,7	0,36	2,17	-1,97 (p>0,05)
Brasil*	6	14	5	93,3	0,88	5,27	-0,87 (p>0,05)
Panamá*	9	13	7	94,4	0,57	3,78	-1,00 (p>0,1)
Peru*	7	12	5	90,5	0,62	4,09	-0,89 (p>0,1)
Argentina*	43	30	21	87,2	0,61	3,96	1,46 (p>0,1)
República Dominicana*	16	12	7	84,2	0,58	3,77	017 (p>0,1)
Cuba*	5	8	3	80	0,17	4,40	1,02 (p>0,1)
Bolívia*	13	4	5	70,5	0,15	1,00	-0,76 (p>0,1)
Guiana Francesa*	17	13	6	65,4	0,65	3,76	-0,07 (p>0,1)
Jamaica*	8	1	2	42,9	0,06	0,42	0,33 (p>0,1)

N = número de indivíduos, s = número de sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica, K = número médio de diferenças nucleotídicas, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, *=populações com sequências *in silico*. RS+Brasil= conjunto de sequências do RS e sequências do Brasil adquiridas *in silico*.

A configuração da rede de haplótipos do RS foi do tipo estrela, possuindo doze haplótipos, sendo o haplótipo 1 compartilhado por vinte e dois indivíduos de todas as localidades, e oito haplótipos exclusivos, espaçados por poucos passos mutacionais (Figura 2). A configuração da rede de haplótipos encontrada com as sequências do RS combinadas com as disponíveis no banco de dados apresenta 50 haplótipos espaçados por poucos passos mutacionais (Figura 3). São destacados três haplótipos (1; 7 e 18), que podem originar diferentes haplogrupos, sendo eles: (i) haplogrupo composto predominantemente por indivíduos do RS, Argentina e Bolívia; (ii) haplogrupo agrupando sequências de indivíduos da Guiana Francesa, República Dominicana e Peru; (iii) haplogrupo com sequências de indivíduos provenientes das ilhas caribenhas e de países localizados no Istmo do Panamá.

O índice de fixação para as populações do RS apresentou, em geral, apresenta valores baixos, indicando falta de estruturação genética entre as populações, sendo que as únicas populações que se diferenciaram foram EL e SL (Tabela 3). Considerando as populações obtidas no banco de dados, observa-se que a população

da Argentina e a do RS apresentam baixa estruturação genética (F_{ST}=0,07), enquanto que comparando o RS com as sequências do Brasil nota-se um alta estruturação (F_{ST}=0,257), semelhante a todas as demais populações (Tabela 4). O teste de Mantel não apresentou correlação entre a distância genética e a distância geográfica (r=0,082 e a probabilidade de encontrar correlação maior ou igual foi de P=0,008 e menor ou igual de P=0,992).

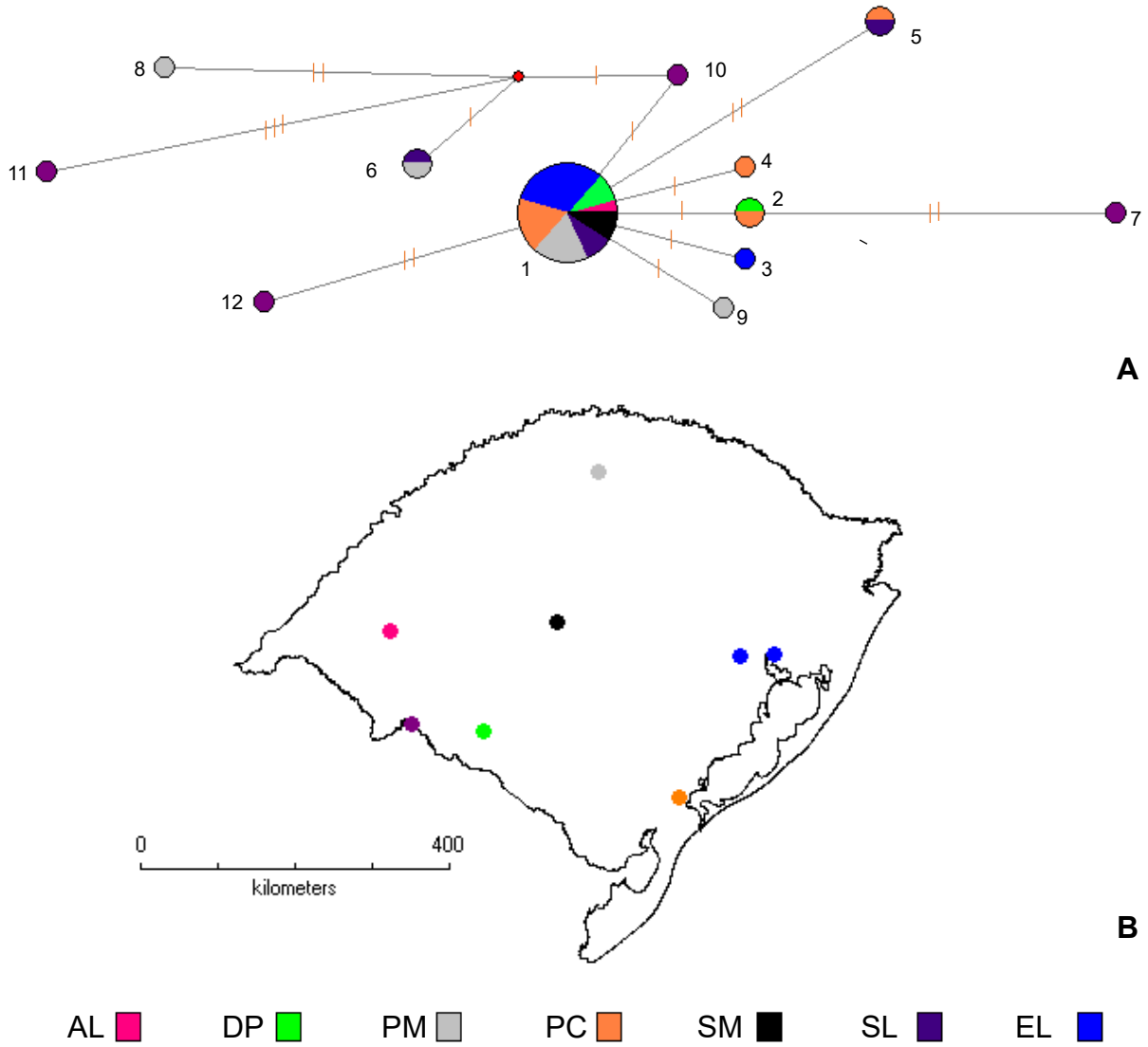

Figura 2 – A) Rede de haplótipos construída usando o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, os diâmetros são proporcionais ao número de indivíduos, os traços em vermelho representam o número de passos mutacionais. B) Mapa do Rio Grande do Sul demostrando os pontos em que os indivíduos de cada população foi coletado. Sendo: AL – Alegrete; DP – Dom Pedrito; PM – Palmeira das Missões; PC – Pelota; SM – Santa Maria; SL – Santana do Livramento; EL – Eldorado do Sul.

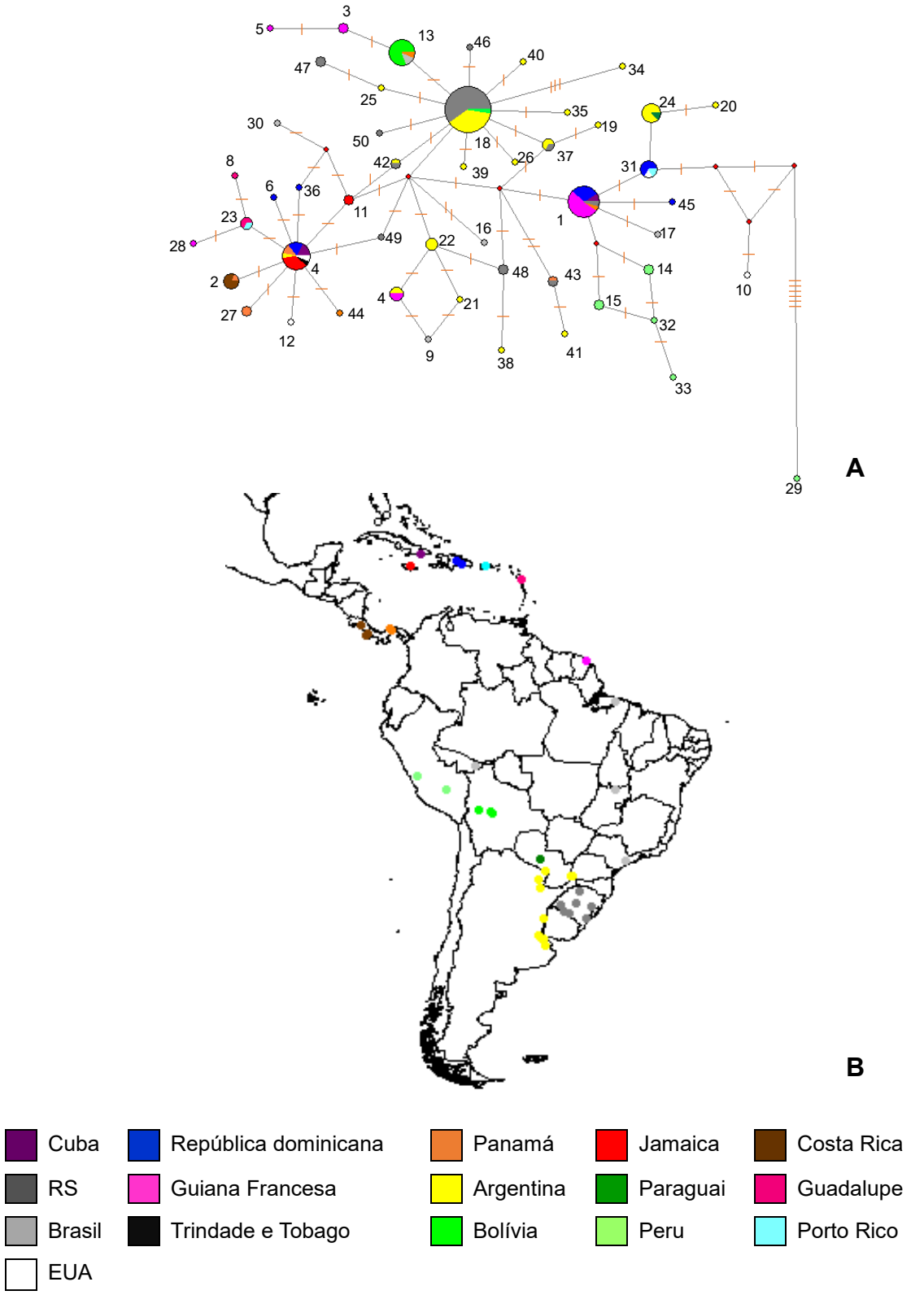

Figura 3 – A) Rede de haplótipos construída usando o algoritmo median-joining no programa Network utilizando as sequências *in silico* e as sequências produzidas neste estudo. Os círculos representam diferentes haplótipos, os diâmetros são proporcionais ao número de indivíduos, os traços em vermelho representam o número de passos mutacionais. B) Mapa da América do Sul com a localização das populações buscadas *in silico* e as coletadas nesse trabalho.

Tabela 3 – Índice de fixação para as populações do Rio Grande do Sul. Os valores de F_{st} são vistos abaixo da diagonal, os valores de p F_{st} são vistos acima da diagonal, em negrito a comparação com valores significativos .

	SM	SL	PM	PC	EL	DP	AL
SM	*	0.783 ± 0.004	0.999 ± 0.000	0.999 ± 0.000	0.999 ± 0.000	0.999 ± 0.000	0.999 ± 0.000
SL	-0.14	*	0.184 ± 0.004	0.165 ± 0.003	**0.006 ± 0.001**	0.777 ± 0.004	0.999 ± 0.000
PM	-0.22	0.042	*	0.175 ± 0.004	0.196 ± 0.004	0.530 ± 0.005	0.999 ± 0.000
PC	-0.313	0.069	0.027	*	0.129 ± 0.003	0.999 ± 0.000	0.999 ± 0.000
EL	-0.318	**0.184**	0.088	0.015	*	0.276 ± 0.004	0.999 ± 0.000
DP	-0.200	-0.085	-0.043	-0.167	0.241	*	0.999 ± 0.000
AL	0.000	-0.667	-0.810	-1.000	-1.000	-1.000	*

AL – Alegrete; DP – Dom Pedrito; PM – Palmeira das Missões; PC – Pelota; SM – Santa Maria; SL – Santana do Livramento; EL – Eldorado do Sul

Tabela 4 – Índice de fixação para as populações obtidas do banco de dados BOLD. Os va-lo-res de Fst são vistos abaixo da diagonal, os valo-es de p Fst são vistos acima da diagonal, em negrito va-ores significativos .

	RS	BRA	ARG	BOL	JAM	CRC	CUB	DOM	GF	GP	PAN	PAR	PER	TRI	PUR	USA
RS		**0,002**	**0,004**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,007**	**0,000**	1,000	**0,000**	**0,005**	1,000	**0,000**
BRA	**0,257**		0,167	**0,001**	**0,001**	**0,009**	0,356	0,058	0,052	0,639	0,236	1,000	**0,001**	0,964	1,000	0,636
ARG	**0,077**	0,041		**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,022**	**0,000**	**0,000**	0,082	**0,003**	1,000	**0,000**	0,101	1,000	**0,029**
BOL	**0,395**	**0,482**	**0,285**		**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,024**	**0,000**	1,000	**0,000**	**0,015**	1,000	**0,000**
JAM	**0,586**	**0,266**	**0,363**	**0,930**		**0,002**	0,123	**0,002**	**0,000**	**0,013**	0,241	1,000	**0,000**	**0,019**	1,000	**0,048**
CRC	**0,684**	**0,348**	**0,466**	**0,975**	**0,770**		**0,032**	**0,000**	**0,000**	**0,030**	**0,033**	1,000	**0,003**	0,064	1,000	**0,032**
CUB	**0,469**	-0,016	**0,186**	**0,752**	0,263	**0,421**		0,261	0,118	0,484	0,487	1,000	**0,001**	0,480	1,000	0,550
DOM	**0,521**	0,148	**0,264**	**0,649**	**0,476**	**0,531**	0,026		0,249	0,067	**0,009**	1,000	**0,000**	1,000	1,000	0,247
GF	**0,449**	0,140	**0,203**	**0,570**	**0,523**	**0,570**	0,121	0,014		0,051	**0,002**	1,000	**0,000**	0,355	1,000	0,0873
GP	**0,411**	-0,051	0,185	**0,732**	**0,336**	**0,456**	-0,013	0,271	0,289		0,692	1,000	**0,009**	0,792	1,000	0,3936
PAN	**0,399**	0,039	**0,215**	**0,597**	0,029	**0,206**	-0,046	**0,267**	**0,311**	-0,060		1,000	**0,000**	0,142	1,000	0,196
PAR	0,756	0,141	0,368	0,981	0,945	1,000	0,357	0,058	0,093	0,417	0,507		0,252	0,667	1,000	0,801
PER	**0,662**	**0,333**	**0,445**	**0,790**	**0,694**	**0,687**	**0,413**	**0,409**	**0,397**	**0,419**	**0,476**	0,415		0,112	1,000	**0,010**
TRI	**0,560**	-0,144	0,159	**0,874**	**0,635**	0,662	-0,232	-0,245	-0,078	-0,113	0,060	-0,500	0,254		1,000	0,729
PUR	0,508	-0,408	0,141	0,961	-0,714	1,000	-0,500	0,211	0,310	-0,750	-0,789	1,000	0,438	-0,500		1,000
USA	**0,507**	-0,037	**0,206**	**0,725**	**0,385**	**0,413**	-0,083	0,043	0,130	-0,014	0,083	-0,072	**0,290**	-0,356	-0,451	

RS = Rio grande do sul; BRA = Brasil; ARG = Argentina; BOL = Bolívia; JAM = Jamaica; CRC =Costa Rica; CUB = Cuba; DOM = República Dominicana; GF = Guiana Francesa; GP = Guadalupe; PAN = Panamá; PAR = Paraguai; PER = Peru; TRI = Trindade e Tobago; PUR = Porto Rico; USA = Estados Unidos da América.

5. Discussão

Os resultados deste trabalho demonstram que os indivíduos de *J. evarete* do RS, de forma geral, não apresentam estruturação genética, sendo sugerida a existência de uma grande população, dividida nas subpopulações estudadas.

A baixa diversidade encontrada pode estar relacionada com: a) o efeito da migração nessa população; b) a distribuição dessa população em comparação com a da espécie; c) a história de vida dessa espécie. O fluxo gênico tem potencial de homogeneizar populações (FREEMANN, 2009), sabe-se que essa espécie apresenta comportamento migratório, tendo sido registrado o comportamento migratório durante a coleta dos indivíduos de Palmeira das Missões (ISERHARD, comunicação pessoal). Os resultados desse trabalho indicam que a migração de indivíduos do RS pode estar reduzindo a possibilidade de estruturação genética na escala geográfica estudada. Para conclusões mais precisas relacionadas ao fluxo gênico, é interessante realizar a análise de outros marcadores moleculares.

Outra possibilidade para a baixa diversidade genética é que a população do RS estaria próxima do limite sul de sua distribuição geográfica. Segundo a teoria "*central–marginal hypothesis*" populações próximas do limite de sua distribuição apresentam menor diversidade genética e maior diferenciação do que as populações localizadas no centro da distribuição geográfica da espécie. Considerando isso, tais populações apresentam ciclos mais rápidos de extinção e recolonização, podendo ser observado efeitos de gargalo e de fundador mais frequentemente (ECKERT; SAMIS; LOUGHEED, 2008). Sabe-se que o gênero se dispersou para o continente americano entre 2 a 4 milhões de anos (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007) e que a diversificação dos dois grandes clados (clado predominantemente de indivíduos da América do Norte e clado de indivíduos da América do Sul) ocorreu há aproximadamente 2 milhões de anos, no Pleistoceno inferior (PFEILER; JOHNSON; MARKOW, 2012). O Pleistoceno no hemisfério sul foi caracterizado pela alternância entre clima seco e úmido (HAFFER, 1997). É provável que tenham ocorrido muitos eventos que causaram o efeito de gargalo durante o período de diversificação desse grupo. Considerando essa informação, é esperado que as populações do RS, Uruguai e sul da Argentina apresentem resultados semelhantes.

A única população ao sul do RS estudada foi a população da Argentina. Contudo, essa população apresenta diversidade nucleotídica e haplotípica maiores do que a população do RS. Isso pode ocorrer devido a uma amostragem menos homogênea em maior área geográfica [Figura 3, B; Buenos Aires (n=26), Corrientes (n=3;), Formosa (n=5), Entre Rios (n=4), Misiones (n=5)]. Além disso, os resultados indicam baixa estruturação genética entre RS e Argentina, mostrando essas localidades sejam, possivelmente, subpopulações. A comparação entre RS e Brasil não mostram o mesmo resultado, ressaltando que as os indivíduos do Brasil estão geograficamente mais distantes do que os da argentina), com uma lacuna de amostragem nas regiões da Amazônia, Caatinga e Cerrado (Figura 3B). Inclusive a inclusão de amostragem nessas regiões pode aumentar o número de haplótipos intermediários visto na rede de haplótipos.

Contudo, é importante enfatizar que, o que é considerado como população da Argentina é morfologicamente identificado como *J. genoveva* e *J. wahlbergi* (apêndice B) e a do Brasil identificado como *J. evarete* e *J. genoveva*. Este resultado reforça a necessidade de uma revisão morfológica de adultos e estados imaturos em ampla escala geográfica. Também deve-se levar em conta aspectos comportamentais e de história natural que passam alterar a morfologia devido a alterações metabólicas, como o hábito alimentar de *Junonia*.

6. Considerações finais

Ao término desse estudo, pode-se concluir que:

- Há apenas uma população de *J evarete* no RS.
- A população de *J. everete* do RS apresenta baixa diversidade nucleotídica e haplotípica.
- A população da Argentina é a que mais se assemelha com a população do RS.
- Há necessidade de aumentar a amostragem ao norte da América do Sul
- Mais marcadores moleculares devem ser analisados

Referências

BANDELT, H-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific hylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BORCHERS, T. E.; MARCUS, J. M. Genetic population structure of buckeye butterflies (Junonia) from Argentina. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 242–255, 2015.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effect of hostplant genotype and predators on iridoid glycoside content of pupae of a specialist in- sect herbivore, *Junonia coenia* (Nymphalidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 25, p. 571–580, 1997.

BRÉVIGNON, L.; BRÉVIGNON, C. Le genre Junonia en Guyane Nouvelles observations et révision systématique (Lepidoptera : Nymphalidae). **Lépidoptères de Guya:** Les *Junonia* De Guyane, p. 1-35, 2012.

CHAPMAN, J.W.; DRAKE, V.A.; REYNOLDS, D.R. Recent Insights from Radar Studies of Insect Flight. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 337–356, 2011.

ECKERT, C.G. SAMIS, K.E.; LOUGHEED, S.C. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. **Molecular ecology**, v. 17, p. 1170-1188, 2008.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564-567, 2010.

FOLMER, O. M.; BLACK, W.; HOEN, R.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Cambridge, v. 3, p. 294-299, 1994.

FREELAND, J.R.; MAY, M.; LODGE, R.; CONRAD. K. F. Genetic diversity and widespread haplotypes in a migratory dragonfly, the common green darner Anax junius. **Ecological Entomology**, v. 28, p. 413–421, 2003.

FREEMANN, Scott; HERRON, John C. **Análise evolutiva**, 4.ed. Porto Alegre, Artmed, 2009, p. 230-232.

GEMMELL, A. P, BORCHERS, T.E., MARCUS, J.M. Molecular Population Structure of Junonia Butterflies from French Guiana, Guadeloupe, and Martinique. **Psyche: a journal of entomology**, v. 2014, p.1-21, 2014.

HAFERNIK, J. E. Phenetics and ecology of hybridization in buckeye butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). **University of California Publications in Entomology**, California, v. 96, p. 1–109, 1982.

HAFFER J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 451–476, 1997.

KODANDARAMAIAH, U. Eyespot evolution: phylogenetic insights from *Junonia* and related butterfly genera (Nymphalidae : Junoniini). **Evolution & Development**, Malden, v. 11, n. 5, p. 489–497, 2009.

KODANDARAMAIAH, U.; WAHLBERG, N. Out-of-Africa origin and dispersal-mediated diversification of the butterfly genus *Junonia* (Nymphalidae: Nymphalinae). **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 20, n. 6, p. 2181–2191, 2007.

KUMAR, S.; STECHER, G. E.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.33, n.7, p. 1870-1874, 2016.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data P. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOVELESS, M.D; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 15, p. 65-95. 1984.

LOW, V. L.; NORMA-RASHID, Y., YUSOFF, A.; VINNIE-SIOW, W. Y.; PRAKASH, B. K.; TAN, T. K.; NOORHIDAYAH, M.; CHEN, C. D.; SOFIANAZIRUN, M. Pleistocene demographic expansion and high gene flow in the Globe Skimmer dragonfly Pantala flavescens Fabricius (Odonata: Libellulidae) in Peninsular Malaysia. **Zoologischer Anzeiger** v. 266, p. 23–27, 2017.

MILLER, M. P. Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information**, Journal of Heredity**, v. 96, n. 6, p. 722–724, 2005.

MONTEIRO, A.; PRUDIC. K. L. Multiple approaches to study color pattern evolution in butterflies. **Trends in Evolutionary Biology**, Itália. v. 2, n. 2, 2010.

PELHAM, J. P. A catalogue of the butterflies of the United States and Canada. **Journal of research on Lepidoptera,** United States, v. 40 p. 652, 2008.

PFEILER, E.; JOHNSON, S.; MARKOW, T. A. DNA barcodes and insights into the relationships and systematics of buckeye butterflies (Nymphalidae: Nymphalinae: Junonia) From The America. **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 66, n. 4, p. 185–198, 2012.

PFEILER, E; MARKOW, T. A. Population connectivity and genetic diversity in longdistance migrating insects: divergent patterns in representative butterflies and dragonflies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.122, n. 2, p. 479–486, 2017.

PFEILER E.; NAZARIO-YEPIZ, N. O.; PÉREZ-GÁLVEZ, F.; CHÁVEZ-MORA, C. A.; LACLETTE, M. R. L.; RENDÓN-SALINAS, E.; MARKOW, T. A. Population genetics of overwintering monarch butterflies, Danaus plexippus (Linnaeus), from central Mexico inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. **Journal of Heredity**, v. 108, p. 163–175, 2017.

ROBE, L. J.; MACHADO, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. The DNA Barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological science**, Tokyo, v. 29, p. 714–724. 2012.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annals of the Entomological Society of America** v.87, p.651-701, 1994.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 5, p. 233-241, 1996.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TILDEN, J. W. Comments on the Nearctic members of the genus *Precis* Huebner. **Journal of research on Lepidoptera**, United States, v. 9, p. 101–108, 1971.

TROAST, D.;SUHLING, F. JINGUJI, H.; SAHLÉN, G.; WARE, J. A global population genetic study of Pantala flavescens, **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

TURNER, T. W.; PARNELL, J. R. The Identification of two species of Junonia Hübner (Lepdoptera:Nymphalidae):J. Evarete and J. genovera in jamaica. **Journal of research on Lepidoptera**, United States, v. 24, n. 2, p. 142–153, 1985.

WEI, S. J.; SHI, B. C.; GONG, Y. J.; JIN, G. H.; CHEN, X. X.; MENG, X. F. Genetic Structure and Demographic History Reveal Migration of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from the Southern to Northern Regions of China, **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e59654, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A – Índices de diversidade genética

Tabela 1A - Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica das populações com quatro ou menos indivíduos de *J. evarete* do Rio Grande do Sul e das populações pertencentes a mesma unidade taxonômica indicada pelo *BIN*.

População	N	S	H	Hd (%)	π (%)	K	Teste D de Tajima
DP	3	1	2	66,7	0,1	0,67	nc
SM	2	0	1	0	0	nc	nc
AL	1	nc	1	Nc	nc	n	nc
Estados Unidos (EUA)	4	9	4	100	0,82	5,5	1,19 (p>0,1)
Costa Rica*	4	0	1	0	0	nc	nc
Guadalupe*	3	2	2	66,7	0,23	1,33	nc
Porto Rico*	2	6	2	100	0,92	6	nc
Paraguai*	1	nc	1	Nc	nc	nc	nc
Trindade e Tobago	1	nc	1	Nc	nc	nc	Nc

N = número de indivíduos, s = número de sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica, K = número médio de diferenças nucleotídicas, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, nc = não calculado.

Apêndice B – Localidade das populações provenientes do banco de dados *Barcode of Life Database*

Tabela 1B – Localidade, espécies e número de acesso das sequências *in silico*

País	Localidade	Espécie	N	Número de acesso GenBank
Brasil	Acre	*J. evarete*	2	EU053295; EU053296
	Goiás	*J. evarete*	2	EU053295; EU053296
	Pará	*J. evarete*	1	JQ430732
	São Paulo	*J. genoveva*	1	JQ430729
Argentina	Buenos Aires	*J. genoveva*	17	KF292238; KF292239; KF292242; KF292244; KF292241; KF292232; KF292233; KF292234; KF292236; KF292237; MACN-Bar-Lep-ct 00046; MACN-Bar-Lep-ct 00049; MACN-Bar-Lep-ct 00050; MACN-Bar-Lep-ct 00051; MACN-Bar-Lep-ct 00053; MACN-Bar-Lep-ct 03063;MACN-Bar-Lep-ct 03070
		J. wahlbergi	9	KF292245; KF292246; KF292247; KF292248; KF292249; KF292250; KF292251; KF292252; KF292253
	Corrientes	*J. genoveva*	3	MACN-Bar-Lep-ct 03681; MACN-Bar-Lep-ct 03712; MACN-Bar-Lep-ct 03742
	Entre Rios	*J. genoveva*	4	MACN-Bar-Lep-ct 01605; MACN-Bar-Lep-ct 01722; MACN-Bar-Lep-ct 01839; MACN-Bar-Lep-ct 01842
	Formosa	*J. genoveva*	5	MACN-Bar-Lep-ct 02616; MACN-Bar-Lep-ct 02771; MACN-Bar-Lep-ct 03868; MACN-Bar-Lep-ct 03880; MACN-Bar-Lep-ct 03884
	Misiones	*J. genoveva*	5	MACN-Bar-Lep-ct 03868; MACN-Bar-Lep-ct 03880; MACN-Bar-Lep-ct 03884
Bolívia	La Paz	*Junonia sp.*	1	MACN-Bar-Lep-ct 03257
	?	*J. evarete*	9	KM287948; KM287949; KM287950; KM287951; KM287952; KM287953; KM287954; KM287955; KM287956
		J. genoveva	3	KM287945; KM287946; KM287947
Costa Rica	Putarenas	*Junonia sp.*	3	INB0003434656; INB0004104238; INB0004104307
	San Jose	*J. genoveva*	1	KM287926
Cuba	?	*J. evarete*	5	KM288249; KM288252; KM288253; KM288255; KM288256
Repúbluca Dominicana	?	*J. evarete*	6	KM288260; KM288261; KM288262; KM288263; KM288265; KM288266
Guiana Francesa	?	*Junonia sp.*	10	JQ430723; JQ430724; JQ430725; WI-JAG-1047; WI-JAG-1048; WI-JAG-1054; WI-JAG-218; WI-JAG-219; WI-JAG-220; WI-JAG-221
		J. divaricata	3	LCB0013; LCB0014; LCB0015
		J. evarete	5	JQ430730; LCB0001; LCB0002; LCB0004; LCB0005
		J. genoveva	1	JQ430728
		Junonia sp.	1	JQ430722
		J. wahlbergi	7	LCB0018; LCB0019; LCB0020; LCB0021; LCB0023; LCB0025; LCB0026
Gualalupe	?	*J. evarete*	1	EU053297
		J. genoveva	2	JQ430726; JQ430727

Continuação

País	**Localidade**	**Espécie**	**N**	**Número de acesso GenBank**
Jamaica	?	*J. evarete*	8	KM28791; KM287913; KM287914; KM287915; KM287917; KM287918; KM287919; KM287920
Panamá	Colon	*Junonia sp.*	2	PRH_G_078; PRH_G_102
	Panamá	*Junonia sp.*	2	PRH_R_075; PRH_R_080
		J. evarete	5	YB-BCI55855; YB-BCI55881; YB-BCI55882; YB-BCI55896; YB-BCI63579
Paraguai	?	*J. evarete*	1	KM288268
Peru	Cuzco próximo à Laguna Huacracocha	*J. vestina*	6	KM288269; KM288270; KM288271; KM288272;KM288273; KM288274; KM288269; KM288270; KM288271; KM288272; KM288273; KM288274
		J. vestina	1	JQ430721
Porto Rico	?	*Junonia sp.*	2	WI-JAG-1052; WI-JAG-228
Trindade e Tobabo	?	*Junonia sp.*	1	DMTRN-0067
Estados Unidos	Florida	*J. evarete*	2	KM288088; KM288090
		J. genoveva	2	KM288218; KM288246