

## ANÁLISE PRÉVIA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *JUNONIA* NO RIO GRANDE DO SUL

MAYANA RABÊLO MOSCOSO<sup>1</sup>; CRISTIANO AGRA ISERHARD<sup>2</sup>; JULIANA CORDEIRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [maya\\_moscoso@hotmail.com](mailto:maya_moscoso@hotmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética IB/UFPEL – [cristianoagra@yahoo.com.br](mailto:cristianoagra@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética IB/UFPEL – [jlncdr@gmail.com](mailto:jlncdr@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A Ordem Lepidoptera (Insecta) possui aproximadamente 146.000 espécies descritas, 13% correspondendo à borboletas (HEPPNER, 1991). No Brasil estão catalogadas 3.280 espécies de borboletas (DUARTE et al., 2012), distribuídas em seis famílias: Hesperidae, Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Riodinidae e Nymphalidae (WAHLBERG et al., 2009). Dentro desta última inclui-se o gênero *Junonia*, que compreende aproximadamente 30 espécies, sendo conhecidas como borboletas “buckeye”. Nas Américas são conhecidas nove espécies, sendo várias delas crípticas, e diversas subespécies. O número total de espécies e suas relações ecológicas no gênero ainda é motivo de discussão (TURNER & PARNELL, 1985), e uma das razões é que elas possuem grande variação geográfica e polifenismo sazonal. A diferenciação morfológica é insuficiente para o reconhecimento das espécies, geralmente baseando-se em características como coloração, comportamento e uso de plantas hospedeiras.

Desde 2003, a técnica de DNA Barcode tem sido utilizada para delimitar espécies já reconhecidas e identificar novas espécies (HEBERT et al., 2003; 2004). Utilizando-se esta técnica, verificou-se que a identificação taxonômica das espécies de *Junonia* é bastante imprecisa (PFEILER et al., 2012a; 2012b; BOCHERS & MARCUS, 2014; GEMMELL et al. 2014). O objetivo desse trabalho foi comparar as sequências de *Junonia* coletadas no Rio Grande do Sul com as sequências disponíveis de espécimes brasileiros, a fim de observar a diversidade genética encontrada.

### 2. METODOLOGIA

Os espécimes de *Junonia* foram coletados com redes entomológicas na região do Morro São Pedro em Porto Alegre (51°07'89"O 30°10'6"S). Após a coleta, os indivíduos foram mortos por compressão torácica, armazenados em envelopes entomológicos e encaminhados para o Laboratório de Diversidade Genética e Evolução, no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da UFPEL. Para extração de DNA dos espécimes, foram utilizadas duas pernas de cada indivíduo utilizando o *kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen). As reações de PCR foram feitas com volume final de 25µL e temperatura de anelamento de 48°C. Os *primers* utilizados foram os *primers* universais LCO1490 e HCO2198 (HEBERT et al., 2003). A reação foi purificada com o *kit Illustra GFX Purification* (GE Healthcare) e enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen. A qualidade dos cromatogramas do sequenciamento foi verificada com o programa FinchTV v1.4.0 (Geopiza, Inc.). As sequências consenso foram montadas com auxílio do pacote de programas Stadem Package (STADEM, 1996), e o

alinhamento das sequências com a ferramenta ClustalW (HIGGIS et al., 1994) contida no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). As estimativas de diversidade genética foram calculadas no programa DnaSP5.19 (LIBRADO e ROZAS, 2009). A rede de haplótipos foi construída usando o algoritmo *median-joining* no programa Network (BANDELT et al., 1999). As sequências de *Junonia* brasileiras utilizadas para comparação (Tabela 1) foram acessadas no site *Systematics and Evolution of Nymphalidae* ([www.nymphalidae.net](http://www.nymphalidae.net)).

TABELA 1. Sequências encontradas no banco de dados *online* e utilizados para comparação, associadas à identificação taxonômica.

Espécie	Voucher	Localidade
<i>Junonia evarete</i>	NW12620	Acre
<i>Junonia evarete</i>	NW12930	Acre
<i>Junonia evarete</i>	NW362	Goiás
<i>Junonia evarete</i>	NW8415	Goiás
<i>Junonia evarete</i>	NW1513	Pará
<i>Junonia genoveva</i>	NW1552	São Paulo

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisadas duas sequências de *Junonia* sp. provenientes de Porto Alegre. O tamanho total das sequências foi de 672pb apresentando apenas 01 sítio polimórfico entre elas. Em relação à diversidade genética, foram analisadas as oito sequências, as obtidas neste trabalho juntamente com as seis obtidas no banco de dados *online*. O número total de nucleotídeos analisados foi de 633pb, aumentando o número de sítios polimórficos para 14pb. Das oito sequências analisadas, sete representam diferentes haplótipos, sendo as sequências de *J. evarete* coletadas no Acre representantes de um mesmo haplótipo. Desta forma, a diversidade haplotípica resultou em Hd:0,964. A diversidade nucleotídica entre as sequências foi de  $\pi$ : 0,007.

A análise de rede de haplótipos (Figura 1) mostrou que as sequências estão relacionadas por poucos passos mutacionais, com exceção das amostras do Goiás, que apresentaram cinco passos mutacionais únicos. Com relação ao único indivíduo de *J. genoveva* aqui representado, se mostrou muito similar às sequências de *J. evarete*, potencialmente representando um equívoco de identificação. Em relação às sequências do presente trabalho, elas se mostraram muito mais próximas às de distribuição no Acre, com apenas um ou dois passos mutacionais.

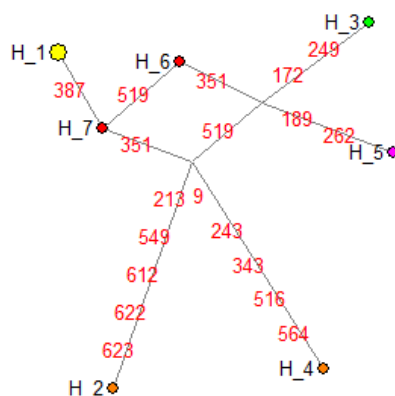


Figura 1. Rede de haplótipos das sequências analisadas neste trabalho. Cada círculo representa um haplótipo. O tamanho do círculo representa a frequência do haplótipo. As cores representam as localidades, sendo: amarelo – Acre; verde – Pará; rosa – São Paulo; laranja – Goiás; vermelho – as sequências representando o Rio Grande do Sul. Os números representam os sítios nucleotídicos onde ocorreram mutações, diferenciando os haplótipos.

#### 4. CONCLUSÕES

A técnica de rede de haplótipos se mostrou informativa para comparação entre diferentes espécies, mostrando que *J. genoveva* tem alta similaridade de sequencias com *J. evarete*. Além disso, foi possível verificar que as amostras do sul do Brasil são bastante próximas das amostras do Norte do Brasil (Acre), indicando que talvez exista uma grande miscigenação entre as populações.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDELT, H. J. et al. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology**, v. 16, p. 37-48, 1999

BORCHERS, T. E. & MARCUS, J. M. Genetic population structure of buckeye butterflies (Junonia) from Argentina, **Systematic Entomology**, London, vol. 39, no. 2, p. 242–255, 2014

DUARTE, M. et al. Lepidoptera. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B. de; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p. 625-682.

GEMMELL, A. et. al. Molecular Population Structure of Junonia Butterflies from French Guiana, Guadeloupe, and Martinique, **Psyche**, Cambridge vol. 2014, 21 pages, 2014.

HEBERT, P.D.N. et. al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 101, p. 812 - 817, 2004

HEPPNER, J. B. Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. **Tropical Lepidoptera**, Gainesville, v. 2, p. 1-85, 1991

HIGGINS et. al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, **Nucleic Acids**, n. 22, p. 4673-4680, 1994

LIBRADO, P., ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 5, n. 25, p. 14510-1452, 2009

PFEILER, E. et. al. DNA barcodes and insights into the relationships and systematics of buckeye butterflies (Nymphalidae: Nymphalinae: Junonia) from the Americas. **Journal of the Lepidopterists' Society**, Gainesville, v. 66, p. 185–198, 2012a

PFEILER, E. et. al. Insights into population origins of Neotropical Junonia (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae) based on mitochondrial DNA. **Psyche**, Cambridge, v. 2012, 2012b

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, n. 30, p. 2725-2729, 2013

TURNER, T.W. & PARNELL, J.R. The identification of two species of Junonia Hubner (Lepidoptera: Nymphalidae): *J. evarete* and *J. genoveva* in Jamaica. **Journal of Research on the Lepidoptera**, Estados Unidos, v.24, p. 142–153, 1985

WAHLBERG, N. et. al. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. **Proceedings Of The Royal Society**, London, v.272, p. 1577-1586, 2005