

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Junonia* (LEPIDOPTERA:
NYMPHALIDAE) BASEADA NO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I****CAROLINA PREDIGER¹; CRISTIANO AGRA ISERHARD ²; JULIANA CORDEIRO³**¹*Universidade Federal de Pelotas – carolinaprediger@hotmail.com*²*Universidade Federal de Pelotas – cristianoagra@yahoo.com.br*³*Universidade Federal de Pelotas – juliana.cordeiro@ufpel.edu.br***1. INTRODUÇÃO**

O gênero *Junonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) é monofilético, com distribuição cosmopolita concentrado especialmente em regiões tropicais (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007). Na América há nove espécies com registros desde o Canadá até o sul da América do Sul (BORCHERS; MARCUS, 2014). Estima-se que o gênero se dispersou para as Américas entre 2,3 a 4,2 milhões de anos, e posteriormente se diversificou (KODANDARAMAIAH; WAHLBERG, 2007). Estas espécies apresentam alta capacidade migratória (WILLIAMS, 1930) e existem alguns relatos de hibridização entre elas (RUTKOWSKI, 1971; HAFERNIK, 1982). Os trabalhos que utilizam marcadores moleculares para as espécies de *Junonia* das Américas sugerem que elas se comportam como espécies em anel (BORCHERS; MARCUS, 2014, GEMMELL; BORCHERS; MARCUS, 2014), dificultando a identificação das espécies, seja morfológica ou filogenética. No Rio Grande do Sul há registros de *J. evarete* (Cramer, 1779) e *J. genoveva* (Cramer, 1780) (SCHMIDT; PÉRICO 2015, ISERHARD; ROMANOWSKI 2004), contudo, há divergência quanto à distribuição real dessas espécies.

Com base nisto, torna-se interessante compreender a relação entre as diferentes populações brasileiras de *Junonia*, para que seja possível inferir sobre a evolução do grupo e sua ecologia. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura genética de populações de *Junonia* do sul do Brasil com base do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI).

2. METODOLOGIA

A amostragem foi realizada por colaboradores da Universidade Estadual de Campinas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pelo Laboratório de Ecologia de Lepidoptera da Universidade Federal de Pelotas e ocorreu em nove municípios, totalizando 33 indivíduos de *Junonia* (tabela 1). Neste trabalho, todos os indivíduos foram tratados como pertencentes a uma única espécie, após a análise morfológica. Duas pernas de cada indivíduo foram armazenadas à -20°C, e posteriormente utilizadas para a extração de DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando *DNeasy Blood and Tissue*[®] kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Um fragmento do gene citocromo oxicase I (COI) foi amplificado pela PCR, utilizando o par de primers forward LCO1490 (FOLMER et al 1994) e reverse Nancy (SIMON et al 1994). A PCR foi realizada com volume total de 10µl e seguindo as recomendações do fabricante da enzima *GoTaq*[®] HotStart polymerase (Promega). Foram utilizadas, aproximadamente, 100ng de DNA de cada amostra. A variação de temperatura deu-se da seguinte forma: 3 minutos de desnaturação à 94°C, 30 ciclos de 45 segundos à 94°C, 45 segundos de anelamento dos primers à 56°C e 45 segundos de extensão dos fragmentos à 72°C,

finalizando com 3 minutos à 72°C. Os fragmentos gerados foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1%. Em seguida foram purificados utilizando *QIAquick® PCR purification kit* (Qiagen) e posteriormente foram enviadas para sequenciamento, de ambas as fitas, na empresa Macrogen.

Tabela 1 - Coordenadas Geográficas e número de indivíduos das nove populações amostradas.

População	Coordenadas Geográficas	n*
Eldorado do Sul	30°05'02"S 51°36'58"O	7
Santana do Livramento	30°53'27"S 55°31'58"O	8
Santa Maria	29°41'03"S 53°48'25"O	2
Dom Pedrito	30°58'58"S 54°40'23"O	2
Pelotas	31°46'19"S 52°20'33"O	7
Foz do Iguaçu	25°30'28"S 54°35'11"O	1
Palmeira das Missões	27°53'58"S 53°18'49"O	4
Porto Alegre	30°10'06"S 51°07'89"O	2
Todas as populações		33

*n = número de indivíduos amostrados

A sequência consenso foi montada no programa Stadem Package (STADEM, 1996), e foram alinhadas no programa MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) utilizando o algoritmo ClustalW. A análise da presença de pseudogenes foi feita por meio da identificação de *stop* códons, da relação entre mutações sinônimas em sítios sinônimos (dS) e mutações não-sinônimas em sítios não-sinônimos (dN), e teste de seleção neutra. Todas as análises foram realizadas no programa MEGA7. Informações sobre a diversidade nucleotídica, número de diferenças nucleotídicas, número de haplótipos, e frequências haplotípica, foram geradas no programa DnaSP5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009). A rede de haplótipos foi construída usando o algoritmo median-joining no programa Network 5 (BANDELT et al, 1999). O índice divergência genética entre populações (F_{st}) foi calculado utilizando os programas DNAsp5.10.01 e Arlequin 3.5.2.2. (EXCOFFIER; LISCHER 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 33 fragmentos do gene *COI*. A matriz de dados conteve 724 pb e 17 sítios variáveis foram visualizados. Na análise de pseudogenes, não foi detectado *stop* códon para nenhuma sequência. Todas as sequências apresentaram maior dS do que dN, o que é esperado para sequências que apresentam restrição evolutiva. O teste-Z para o padrão de seleção indicou que essas sequências estão sofrendo seleção purificadora. Logo, pode-se inferir que essas sequências não são pseudogenes e podem ser utilizadas para futuras análises.

Para as 33 sequências, foram visualizados 12 haplótipos. A diversidade haplotípica (Hd) foi de 66,86% e a diversidade nucleotídica (π) foi de 0,342%. A população com a menor diversidade nucleotídica foi Eldorado do Sul ($\pi = 0,05\%$) e a com maior foi Santana do Livramento ($\pi = 0,74\%$). As populações de Santa Maria, Dom Pedrito, Palmeira das Missões e Porto Alegre apresentaram diversidade haplotípica de 100%, possivelmente devido ao baixo número amostral. Em geral observou-se alta diversidade haplotípica para todas as populações com exceção de

Eldorado do Sul ($H_d = 28,60\%$), o que pode ser resultado de alto fluxo gênico entre as populações.

O índice de divergência genética entre populações (F_{st}) demonstrou diferença genética entre as populações de Palmeira das Missões e Pelotas ($p = 0.00267 \pm 0.0005$); e Palmeira das Missões e Santana do Livramento ($p = 0.00614 \pm 0.0008$). Não houveram diferenças para as demais populações, sendo que as que apresentaram diferenças estão geograficamente distantes.

A rede de haplótipos (Figura 1) demonstrou que existem três haplótipos compartilhados por indivíduos de diferentes localidades. Um dos três haplótipos é compartilhado por 19 indivíduos de todas as localidades amostradas. Os outros dois haplótipos compartilhados foram formados por indivíduos de diferentes locais (Dom Pedrito, Eldorado do Sul e Pelotas; e Pelotas e Santana do Livramento), indicando a existência de fluxo gênico entre as populações.

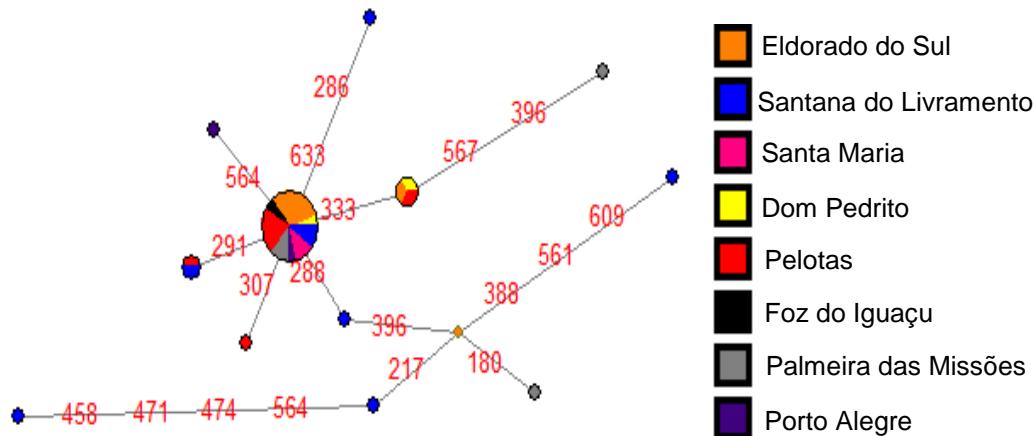


Figura 1 - Rede de haplótipos construída usando o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, os diâmetros são proporcionais à frequência dos haplótipos, os números representam os sítios onde ocorreram mutações.

Avaliando as informações obtidas observamos que a maioria das populações apresenta alto fluxo gênico, provavelmente devido a alta capacidade migratória de *Junonia*. As populações que apresentam maior diversidade haplotípica foram as populações que parecem não apresentar fluxo gênico entre si. Os haplótipos de Palmeira das Missões e Pelotas apresentaram distâncias de dois a quatro passos mutacionais e Palmeira das missões e Santana do Livramento de dois a seis passos mutacionais. Os resultados de F_{st} sugerem que a origem dos haplótipos presente nos indivíduos dessas populações podem não ser idênticos por descendência, e sim por outras razões. Contudo uma amostragem maior é necessária para conclusões mais precisas.

4. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho apontam uma baixa variabilidade do gene *COI* entre na maioria das populações de *Junonia* amostradas, provavelmente devido a seus hábitos migratórios permitirem fluxo gênico. Exceções foram observadas apenas nas populações possivelmente mais isoladas dos municípios de Palmeira das Missões, Pelotas e Santana do Livramento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDELT, H-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.37-48, 1999
- BORCHERS, T. E.; MARCUS, J. M. Genetic population structure of buckeye butterflies (*Junonia*) from Argentina. **Systematic Entomology**, v.39, n.2, p.242–255, 2014.
- 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**, 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** v.3, p.294-299, 1994.
- GEMMELL, A.P.; BORCHERS, T.E.; MARCUS, J.M. Molecular Population Structure of *Junonia* Butterflies from French Guiana, Guadeloupe, and Martinique. **Psyche**, 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**, v.96: p.1–109.1982
- ISERHARD, C.A; ROMANOWSKI, H.P. Lista de espécies de borboletas (Lepidoptera, Papilionoidea e Hesperioidae) da região do vale do rio Maquiné, io Maquiné, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n.3, p.649–662, 2004.
- KODANDARAMAIAH, U; WAHLBERG, N. Out-of-Africa origin and dispersal-mediated diversification of the butterfly genus *Junonia* (Nymphalidae: Nymphalinae). **Journal of Evolutionary Biology**, v.20, n.6, p.2181–2191, 2007.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v.33 p.1870-1874, 2016.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data P. **Bioinformatics**, v.25, n.11 p.1451-1452.
- RUTKOWSKI, F. Notes on some south Florida Lepidoptera. **Journal of the Lepidopterists' Society**, v.25, p.137–139, 1971.
- 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.
- SCHMIDT C.A.; PÉRICO, E. Borboletas (Lepidoptera, papilionoidea e hesperioidea), nas Matas ripárias do rio taquari, vale do taquari, rio grande Do sul. **Revista Destaques Acadêmicos**, VOL. 7, N. 3, 2015.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 5, p. 233-241, 1996.
- WILLIAMS, C.B. **The Migration of Butterflies**. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1930.