



## **Filogenia molecular da tribo “Achlyodidini”, com enfoque nos gêneros que se alimentam de *Piper* sp.**

Aluno: Mariana Cirino

Orientador: Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

Co-orientador: Profa. Dra. Karina Lucas da Silva Brandão

### Introdução:

Insetos da Ordem Lepidoptera, que inclui borboletas e mariposas, constituem um dos grupos de organismos mais estudados e bem conhecidos (Boggs, Watt & Ehrlich, 2003). Existe uma grande quantidade de informação relacionada ao grupo em diversas áreas como ecologia, conservação, taxonomia, evolução, dentre várias outras (Boggs, Watt & Ehrlich, 2003; Peña, et al., 2006). As borboletas se dividem em três famílias, sendo que uma das mais ricas em espécies, a família HesperIIDae, tem sido negligenciada há décadas, e apenas recentemente teve suas relações estudadas em detalhe (Warren, Ogawa, & Brower, 2009; Warren, Ogawa, & Brower, 2008; Sahoo et al 2016).

Provavelmente, muitos dos grupos outrora reconhecidos são grupos não-monofiléticos, incluindo desde gêneros até subfamílias (Warren, Ogawa, & Brower, 2008). Um destes casos parece ser a tribo Achlyodidini, da subfamília Pyrginae, um clado com baixo suporte e com diversos gêneros possivelmente não-monofiléticos (Warren, Ogawa, & Brower, 2009; Warren, Ogawa, & Brower, 2008). Os gêneros *Quadrus*, *Ouleus* e *Pythonides* em especial são interessantes por usarem predominantemente espécies de plantas do gênero *Piper* (Piperaceae) como alimento na fase larval (Janzen & Hallwachs, 2009). Essas plantas apresentam algum grau de toxicidade em herbívoros (Dyer & Palmer, 2004). Desta forma, entender as relações de parentesco entre os gêneros da tribo Achlyodidini, incluindo *Quadrus*, *Ouleus* e *Pythonides*, pode ser um suporte importantíssimo nos estudos de interação inseto-planta.

Propomos então a utilização do gene mitocondrial (mtDNA) COI, da região conhecida como “código de barras de DNA” (ou DNA *barcode*). A grande vantagem no uso deste marcador deve-se ao fato de que, em geral, as variações genéticas interespecíficas excedem as variações genéticas intraespecíficas, tornando essa uma ferramenta muito eficiente na discriminação molecular entre espécies (Silva-Brandão, Lyra, & Freitas, 2009).

Este projeto propõe solucionar, através de dados moleculares, a validade e as relações internas da tribo “Achlyodidini”

### Materiais e métodos:

Os experimentos foram realizados com a análise do material genético de 22 indivíduos da tribo Achlyodidini (pertencentes aos 3 gêneros em estudo, Pythonides, Quadrus e Ouleus). A extração do DNA foi realizada utilizando o kit de extração GE Healthcare® Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit e o respectivo protocolo, utilizando 2 pernas de cada indivíduo.

Para a construção da hipótese filogenética para a subfamília Pyrginae foi utilizado o servidor web do software IQTREE (Nguyen *et al.* 2015) usando o método de Máxima Verossimilhança. O melhor modelo evolutivo foi determinado no mesmo software pela implementação do ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017). O suporte dos ramos foi estimado usando 1000 aproximações do método ultrafast bootstrap (UFBoot2) (Hoang *et al.* 2017). A escolha dos grupos externos foi baseada nas relações filogenéticas descritas em Sahoo *et al.* (2016). A matriz final foi composta pelas nossas amostras e por outras 106 amostras de representantes dos gêneros de Pyrginae obtidas do GenBank (124 sequências no total).

Com as sequências COI fizemos a identificação a nível de gênero das nossas amostras, utilizando a ferramenta BLAST, do NCBI, que compara nossas sequências com sequências já pré-existentes no banco de dados.

Para os gêneros *Quadrus*, *Ouleus* e *Pythonides* construímos árvores de distância para cada gênero separadamente, usando o método de Neighbor-Joining (NJ) no programa Geneious v 10.2.6. Alinhamos nossas sequências a todas as sequências disponíveis no GenBank, totalizando uma matriz de 25 táxons para *Quadrus*, 26 para *Ouleus* e 17 para *Pythonides*.

### Resultados e discussões:

Nenhum dos gêneros de interesse foi recuperado como monofilético na hipótese filogenética de Pyrginae obtida com o mtDNA COI, provavelmente devido à falta de resolução que este gene sozinho oferece. Dentre os gêneros recuperados como monofiléticos estão *Achlyodes*, *Aethilla*, *Zera*, *Atames*, *Haemacis* e *Charidia*. O gênero *Milanion* é parafilético, uma vez que *Eburucus* aparecem dentro deste. Os gêneros *Quadrus*, *Pythonides* e *Ouleus* não foram recuperados como monofiléticos, aparecendo espalhados em diversos ramos da árvore.

No caso do gênero *Ouleus*, os exemplares sequenciados no presente trabalho aparecem em um ramo distintos dos obtidos no banco de dados. Para *Quadrus*, um indivíduo identificado como *Q. contubernalis* aparece agrupado dentro de um clado identificado como *Q. cerialis*, sugerindo um possível problema de identificação. Por fim, no gênero *Pythonides*, quatro de nossos espécimes aparecem distribuídos em três diferentes ramos, sendo alguns recuperados como grupo irmão de *P. amarilys*, um como grupo irmão de *P. proxenus*, e o outro foi recuperado em um clado a parte, indicando que provavelmente pertence a alguma outra espécie não disponível no banco de dados.

As árvores filogenéticas de cada gênero estão com sua relação de parentesco melhor resolvidas do que a árvore com todos os gêneros da tribo “Achlyodidini”. São muitos ramos polifiléticos, impossibilitando saber a relação entre os gêneros.

### Considerações finais:

O estudo comprovou que de fato a filogenia dessa família é pouco resolvida e que os dados obtidos, ainda que importantes, não foram suficientes para a resolução desse grupo. Seriam necessários mais indivíduos e mais sequências de outros genes para deixar a árvore mais robusta. Em suma, fica claro que são necessários estudos complementares para que uma resolução adequada deste grupo seja obtida.

## Referências:

- Boggs, C. L., Watt, W. B. & Ehrlich, P. R. (2003). *Butterflies: ecology and evolution taking flight*. Chicago, The University of Chicago Press, 739p
- Peña, C., Wahlberg, N., Weingartner, E., Kodandaramaiah, U., Nylin, S., Freitas, A. V. & Brower, A. V. (2006). Higher level phylogeny of Satyrinae butterflies (Lepidoptera:Nymphalidae) based on DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(1):29–49. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.007>
- Warren, A. D., Ogawa, J. R. & Brower, A. V. (2008). Phylogenetic relationships of subfamilies and circumscription of tribes in the family HesperIIDae (Lepidoptera: Hesperioidea). *Cladistics*, 24(2008):1-35. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00218.x>
- Warren, A. D., Ogawa, J. R., & Brower, A. V. (2009). Revised Classification of the family HesperIIDae (Lepidoptera: Hesperioidea) based on combined molecular and morphological data. *Systematic Entomology*, 34:467-523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.00463>.
- Sahoo, R. K., Warren, A. D., Wahlberg, N., Brower, A. V. Z., Lukhtanov, V. A., Kodandaramaiah, U. (2016). Ten genes and two topologies: an exploration of higher relationships in skipper butterflies (HesperIIDae). *PeerJ* 4:e2653. [10.7717/peerj.2653](https://doi.org/10.7717/peerj.2653)
- Silva-Brandão, K. L., Lyra, M. L. & Freitas, A. V. (2009). Barcoding Lepidoptera: Current Situation and Perspectives on the Usefulness of a Contentious Technique. *Neotropical Entomology*, 38(4):441-451. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2009000400001>
- Janzen, D. H. & Hallwachs, W. 2009. Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica (nn-SRNP-nnnnn voucher codes).
- Dyer, L. A. & Palmer, A. D. (2004). *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*. Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Nguyen, L.-T., Schmidt H. A., von Haeseler A. & Minh B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32:268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. & Jermin L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14:587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Hoang, D. T., Chernomor O., von Haeseler, A., Minh B. Q. & Vinh L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.*, 35:518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx28>