

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**BIOLOGIA E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DA**  
**BRANCA-PORTUGUESA, *EUCHLOE TAGIS* (HÜBNER, 1804)**  
**EM PORTUGAL**



**Eduardo Manuel Graça de Brito Valente Marabuto**

**MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO**

**2009**

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**BIOLOGIA E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DA  
BRANCA-PORTUGUESA, *EUCHLOE TAGIS* (HÜBNER, 1804)  
EM PORTUGAL**



**Eduardo Manuel Graça de Brito Valente Marabuto**

Tese orientada por: Professor Doutor Octávio S. Paulo

Professora Doutora Maria Teresa Rebelo

**MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO**

2009

"They're there in their swarming multitudes.

Millions upon millions of tiny creatures which we rarely observe and even more rarely consider. In large part we ignore them. Most are too small to be seen unaided and those large enough to be visible usually find ways to hide or deceive us."

*David Attenborough - Life in the Undergrowth*

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>A Região Mediterrânica: um hotspot a de biodiversidade</b>	<b>1</b>
<b>A mitigação do problema</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Borboletas como modelos biológicos para a conservação</b>	<b>4</b>
1.2.1 Bio-indicação	5
1.2.2 Efeito guarda-chuva	6
1.2.3 Espécies bandeira: Um estatuto único entre os insectos	7
<b>1.3 Filogenética e Conservação</b>	<b>8</b>
1.3.1 Análise Filogenética, Taxonomia e Filogeografia	8
1.3.2 Estruturação Populacional e Conservação	10
<b>1.4 Uma espécie emblemática: A Branca-Portuguesa (<i>Euchloe tagis</i>)</b>	<b>12</b>
1.4.1 Sistemática e taxonomia	12
1.4.2 Características morfológicas	16
1.4.3 Biogeografia	18
1.4.4 Subespécies	20
1.4.5 História da <i>E. tagis</i> em Portugal	22
1.4.6 Ciclo de vida	24
1.4.7 Ecologia	28

1.4.8 Conservação	32
<b>1.5 Objectivos</b>	<b>35</b>
<b>2. METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Trabalho de campo e amostragem</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Desenvolvimento em cativeiro</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Análise genética</b>	<b>38</b>
2.3.1 Selecção de genes para análise	38
2.3.2 Reacção de PCR e sequenciação	39
2.3.3 Análise filogenética	40
2.3.4 Genética populacional	41
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Distribuição da <i>Euchloe tagis</i> em Portugal</b>	<b>43</b>
3.1.1 As plantas do género Iberis	43
3.1.2 Os solos calcários em Portugal	45
3.1.3 Inferência das áreas de distribuição de <i>E. tagis</i>	47
3.1.4 Locais de ocorrência e sua caracterização	48
3.1.5 Habitats Naturais Prioritários, NATURA 2000.	52
3.1.6 Locais de detecção negativa	53
<b>3.2 Biologia, Comportamento e Desenvolvimento</b>	<b>55</b>
3.2.1 Fenologia e <i>Sex-ratio</i>	55
3.2.2 Comportamento	56
3.2.3 Morfologia dos estádios pré-imaginais	59
3.2.4 Características do estado adulto em Portugal	62

<b>3.3 Análise genética</b>	<b>66</b>
3.3.1 Amostragem	66
3.3.2 Análise filogenética e filogeográfica	67
3.3.3 Genética Populacional	72
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>89</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo I – Artigo publicado I</b>	<b>107</b>
<b>Anexo II – Artigo publicado II</b>	<b>119</b>
<b>Anexo III – Protocolos de extracção e amplificação</b>	<b>120</b>
<b>Anexo IV – Material biológico utilizado</b>	<b>121</b>
<b>Anexo V – Plantas do género Iberis</b>	<b>123</b>
<b>Anexo VI – Distribuição das plantas do género Iberis em Portugal</b>	<b>124</b>
<b>Anexo VII – Habitats da <i>E. tagis</i></b>	<b>125</b>
<b>Anexo VIII – Estádios imaturos de <i>E. tagis</i></b>	<b>127</b>
<b>Anexo IX – Estádio adulto</b>	<b>131</b>
<b>Anexo X – Estádios adultos (imagens de exemplares em colecção)</b>	<b>133</b>
<b>Anexo XI – Outras espécies</b>	<b>134</b>
<b>Anexo XII – Quadro de posições parcimoniosamente informativas</b>	<b>135</b>
<b>Anexo XIII – Matriz de distâncias não corrigidas</b>	<b>136</b>

## AGRADECIMENTOS

Em qualquer Ecosistema, nenhum dos seus elementos funciona isoladamente do meio que o rodeia e tal como os sistemas naturais, este trabalho não teria sido sequer iniciado, quanto mais concluído sem a colaboração, a ajuda ou o apoio de inúmeras pessoas que assim desempenharam um papel crucial para que as páginas que se seguem vissem a luz do dia. A estas pessoas, o meu mais sincero agradecimento; por mais variada que tenha sido a sua contribuição.

Aos meus orientadores mas também colegas e amigos; Professora Maria Teresa Rebelo e Professor Octávio S. Paulo por todo o apoio, me possibilitarem a integração no meio da investigação “a sério” e por todos os conselhos úteis e motivação. Obrigado por me terem aceitado a mim e às “minhas borboletas”!

À Sofia Seabra, à Joana Costa, à Vera Nunes e ao Francisco Pina-Martins por me iniciarem nesse mundo, ao qual eu era um completo estranho, que é o laboratório de genética. Desde a explicação pedagógica de como se pipetam reagentes até à resolução dos mais bizarros problemas causados pelo bicho-papão que habita o laboratório e a revisão dos longos textos que compõem este trabalho... seguramente sem vocês não teria conseguido sobreviver!

Ao maior especialista em borboletas de Portugal, Martin F.V. Corley pelo sempre presente apoio quer na obtenção de bibliografia, dados cartográficos tanto de *Euchloe tagis* como das suas plantas alimentícias, amizade, conselhos úteis, revisão de textos em inglês e por sempre me incentivar a fazer mais pelas borboletas de Portugal. Obrigado.

Aos meus colegas e amigos, co-autores das descobertas feitas sobre a *Euchloe tagis* em Portugal e sem os quais nunca nada disto teria resultado. Obrigado Manuel Dinis Cortes, Ivo Rodrigues, João Pedro Cardoso, Pedro Pires, António Bívar de Sousa e Humberto Grácio; as horas no campo, o gasóleo gasto, os buracos nas redes (e nos pneus!), as trocas de ideias e pontinhos no mapa valeram certamente a pena! Fez-se história... e ciência!

A Ernestino Maravalhas, Martin Honey (BMNH), Javier Olivares, Rafael Esteves Rodrigues, António Vives, Pierre Boyer, François Gilbert e Genage André pela

valiosa contribuição quer na obtenção de bibliografia, quer na obtenção de espécimes de *E. tagis*.

Ao Luís Ferreira pela amizade e permanente apoio, alegria e ajuda no campo na busca pelas borboletas do rochedo de Gibraltar! Aqui foi também essencial o grande dipterologista silencioso Jorge Almeida, o meu amigo insular Ricardo Rocha e sua saltitante Sarah Stow, o grande viking Rui *Tunafish* Nunes, a alegre Nídia Fernandes, a “*shorty Mambo-girl*” Carla Pereira. Muito obrigado amigos!

A Charles Perez, John Cortes e à GONHS (Gibraltar Ornithological and Natural History Society) pelas autorizações de captura de *E. tagis* e outras amostras em Gibraltar além de todas as facilidades concedidas: *thank you very much!*

Um muito especial obrigado aos meus colegas e amigos do Cobig2 e da sala de bolseiros: Ana Margarida Lopes, Bruno Vieira, Diana Rodrigues, Inês Satar, Catarina Dourado, Maryline Dias, Filipa Nunes e demais pelas alegrias partilhadas, especialmente os mui frutuoso almoços e momentos de pura procrastinação, dos quais nasceram algumas das fracturantes ideias que vão salvar o mundo!

Um agradecimento muito especial às minhas amigas Inês Órfão e Rita Martins, sempre presentes nos momentos bons e menos bons, sempre dispostas a levarem com os meus dramas. Vocês sabem que são especiais.

E especiais serão sempre o *wonder group*. Para vocês... Δ

À Lúcia pelo apoio, pela companhia, pela forçada compreensão em todas as horas suprimidas ao tempo em comum, dedicadas às borboletas e à tentativa de as conhecer melhor. Obrigado pela viagem, certamente que aprendi muito com ela.

Esta fixação pela Natureza em todas as suas facetas e mais tarde pela biologia da conservação foi sempre acarinhada e estimulada por aqueles a quem devo tudo. Estes são os meus avós, tanto os que estão agora mais distantes como os que estão mais perto, que toleraram as minhas teimosias com caixas e bichos, os meus pais que de facto partilham o frigorífico com eles e o meu irmão, sempre pronto para me apoiar e estimular. Obrigado pelo tempo, obrigado por sempre terem tornado tudo mais fácil, obrigado pelo apoio, obrigado por mais tantas coisas.

Finalmente, um grande OBRIGADO à Natureza, por ser tão fantástica.



## RESUMO

A Branca-Portuguesa é uma espécie de borboleta (Insecta, Lepidoptera) cuja distribuição abarca a região Atlântico-Mediterrânica entre Portugal e Itália, Marrocos e Argélia, em núcleos fragmentados e divergentes do ponto de vista morfológico. O isolamento das suas populações advém fundamentalmente da sua especificidade ecológica na dependência de solos calcários onde se desenvolve um matagal mediterrânico de fácies calcícola e das plantas de que se alimentam as lagartas, as Assembleias.

Este estudo, apoiado na importância das borboletas como elementos basilares nos ecossistemas, bem como na importância que a sua promoção representa para a conservação dos seus habitats, tem origem na lacuna de conhecimento existente sobre esta espécie em Portugal. A nível nacional, até ao presente apenas era conhecida uma única população, na Serra da Arrábida.

A sinergia entre os dados cartográficos de distribuição dos calcários e das plantas alimentícias permitiu criar um mapa de distribuição potencial da espécie em Portugal e o trabalho de campo comprovou a existência de populações previamente desconhecidas no Alentejo e no Maciço Calcário Estremenho. Todos os locais de ocorrência partilham uma gama de características fundamentais para a sua subsistência. Através do seguimento e caracterização de todas as fases do seu ciclo-de-vida preencheu-se também uma outra lacuna de conhecimento.

Através de um marcador molecular mitocondrial pretendeu-se avaliar o grau de diferenciação genética das populações europeias da espécie bem como inferir a sua história filogeográfica. *E. tagis* apresenta uma elevada diversidade genética não estruturada segundo a taxonomia e terá subsistido na Península durante o Quaternário em isolados policêntricos que sucessivamente entraram em contacto, tornando o padrão filogeográfico difuso.

Com todos estes dados foi possível confrontar informação multidisciplinar para a conservação da Branca-Portuguesa, relevando-se a sua importância como espécie “guarda-chuva” e bio-indicadora de qualidade ecológica, podendo ser integrada, a par de outras espécies prioritárias como “espécie bandeira” dos seus habitats.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Euchloe tagis*, distribuição, filogeografia, estruturação populacional, conservação

## ABSTRACT

The Portuguese Dappled White is a butterfly whose distribution (Insecta, Lepidoptera) encompasses fragmented and morphologically distinct populations in the Atlantico-Mediterranean region from Portugal to Italy, Morocco and Algeria. This fragmentation arises fundamentally of its ecological specificity, depending on limestone soils where a lush Mediterranean calcicole scrubland develops, which is also where its caterpillar foodplants, Candytufts, are to be found.

This study has its origin in the absolute lack of knowledge regarding this species in Portugal and is supported on the keystone importance of butterflies for ecosystems and of their promotion towards the conservation of their habitats. At the national level, until now only one population was known to thrive, at Serra da Arrábida.

The synergy between cartographic data on the distribution of both limestone soils and the butterfly's foodplants made possible the production of a potential distribution map for the species in Portugal and subsequent fieldwork unveiled the existence of previously unknown populations in Alentejo and the Maciço Calcário Estremenho. An *E. tagis* site shares a number of fundamental characters which allow its survival. Through the rearing and description of its early-stages, a gap of knowledge was filled-in.

With the use of a molecular mitochondrial marker it was possible to evaluate the degree of genetic divergence among the European populations of *E. tagis* and infer its phylogeography. This species comprehends a high genetic diversity, albeit not structured according to current taxonomy and probably has thrived in the Península during the entire Quaternary in polycentric isolates with subsequent migration between them making the general phylogeographical pattern diffuse.

With these data we could confront multidisciplinary information towards the conservation of the Portuguese-Dappled-White, emphasizing its importance as an *umbrella species* and a *bio-indicator* of ecological quality. With other charismatic, priority species it can as well be a good flagship species for its habitats.

**KEW WORDS:** *Euchloe tagis*, distribution, phylogeography, population structure, conservation

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Pessoas:

AV – Antonio Vives  
BS – António Bívar de Sousa  
DC – Manuel Dinis Cortes  
EM – Eduardo Marabuto  
FG – François Gilbert  
FSC – Fernando Santos Carvalho  
HG – Humberto Grácio  
IR – Ivo Rodrigues  
JPC – João Pedro Cardoso  
PB – Pierre Boyer  
PP – Pedro Pires  
RR – Rafael Estevez Rodrigues

### Províncias:

AAL – Alto Alentejo  
ALG - Algarve  
BAL – Baixo Alentejo  
E – Estremadura  
TM – Trás-os-Montes

### Outras:

ADN – Ácido desoxirribonucleico  
ADNmt – ADN mitocondrial

*p. ex.* – por exemplo.

*Com. pes.* – comentário pessoal.

*Obs. pes.* – observação pessoal.

*Op cit.* – “*Opus citatum*”, citado anteriormente.

PNSAC – Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros

# INTRODUÇÃO

## 1.1 A Região Mediterrânica: um *hotspot* de biodiversidade

Numa avaliação dos 25 *Hotspots* de Biodiversidade, as regiões mais ricas em espécies de animais e plantas a nível mundial, a Bacia Mediterrânica apareceu sem surpresas como uma das mais ricas mas também uma das mais ameaçadas (Myers *et al.*, 2000) (Figura 1).

A par da Califórnia, da região do Cabo (África do Sul), do sudoeste da Austrália e de uma secção da costa oeste da América do Sul, no Chile, a Bacia do Mediterrâneo possui um clima singular e condições muito próprias (Takhtajan, 1986) caracterizadas pela existência de verões quentes e secos e invernos húmidos mas amenos sendo a vegetação caracteristicamente perenifólia, adaptada à *secura*, onde o factor limitante é a água e existe um período xérico em que Precipitação < 2x Temperatura (Akin, 1991).

Esta região estende-se desde a Península Ibérica até à Jordânia e desde o norte de Itália a Marrocos, abrangendo uma área de aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup>. Inclui ainda milhares de ilhas espalhadas pelo Mediterrâneo e os arquipélagos da Macaronésia.

A sua biodiversidade é extremamente rica, particularmente em plantas e entre as cerca de 25 000 espécies, 13 000 são endémicas (4,3% do total mundial), a fauna do solo é a mais rica do mundo e estima-se que 75% das espécies europeias de insectos (aproximadamente 170 000) estejam limitadas à região Mediterrânica (Baletto & Casale, 1991).

Este *Hotspot* constitui um caso paradigmático uma vez que a sua riqueza biológica se deve fundamentalmente ao isolamento proporcionado pela existência de várias penínsulas (Ibérica, Itálica e Balcânica) e diversas ilhas, à heterogeneidade geomorfológica, climática e de habitats. Por outro lado, tem um historial de mais de 8000 anos de presença humana com a subsequente moldagem do ecossistema pela desflorestação, agricultura e transporte de espécies (Vigne *et al.*, 1997; Blondel & Aronson, 1999). Outro factor relevante na história biogeográfica desta região é a ocorrência de glaciações cíclicas pelo menos até há cerca de 10 000 anos (Mangerud *et al.*, 2004) e que tiveram um efeito profundo no isolamento e diferenciação das populações (Hewitt, 1996, 1999).

Actualmente, os efeitos da população humana fazem-se sentir mais intensamente do que no passado devido ao crescimento populacional acentuado (mais de 455 milhões de pessoas agora dependem da ou vivem na Bacia do Mediterrâneo) e às pressões decorrentes das alterações no ordenamento no território: substituição dos métodos de agricultura tradicional por sistemas intensivos, destruição e fragmentação dos habitats, acção de espécies invasoras exóticas, urbanização galopante especialmente no litoral e fogos florestais (Cuttelod *et al.*, 2009). Restam apenas cerca de 4,3% da vegetação original mediterrânica, a restante área é ocupada por fases sucessionais cada vez mais degradadas e isoladas (Myers *et al.*, 2000). Estas transformações isoladamente ou em conjunto, aliadas aos efeitos das alterações climáticas (Bates *et al.*, 2008), têm vindo a acentuar localmente o problema mundial da perda generalizada de biodiversidade (*p. ex.* CBD, 2002; Vié *et al.*, 2009).



Figura 1: Os 25 mais importantes *Hotspots de Biodiversidade* segundo Myers *et al.* (2000). Destaca-se no centro da imagem e único *Hotspot* em território europeu, a Bacia Mediterrânica.

### A mitigação do problema

Face à perda generalizada de biodiversidade, comparada a uma 6ª grande extinção em massa (WCMC, 1992; Leakey & Lewin, 1995), a situação da região mediterrânica é representativa e têm sido tomadas diversas medidas nacionais e internacionais para garantir a sobrevivência e manutenção da biodiversidade.

A partir de 1992, com a assinatura do tratado da Convenção da Diversidade Biológica foi dada relevância política aos problemas actuaentes sobre a biodiversidade e as suas causas maioritariamente antrópicas. Desde essa altura diversos acordos e

resoluções têm sido tomados para a mitigação do problema, inclusive a ratificação do documento pela União Europeia em 1993 e a adopção da Estratégia Europeia em matéria de Diversidade Biológica, em 1998. Esta última definiu como principais linhas de acção a conservação e utilização sustentável da diversidade biológica, a partilha dos benefícios resultantes da utilização dos recursos genéticos, a investigação, identificação, monitorização e intercâmbio de informações e também a educação, formação e sensibilização. Em 2001, o objectivo de “gestão dos recursos naturais responsabilmente, protegendo e recuperando os habitats naturais e travar o declínio da biodiversidade até 2010” foi pela primeira vez adoptado pela UE na sua Estratégia para o Desenvolvimento Sustentável (CEC, 2001). As resoluções adoptadas oficialmente em 2003 na Conferência de Kiev e o documento final com as directrizes de acção foram publicados em 2006 (CEC, 2006). Esta iniciativa, denominada “Countdown 2010” apoia-se em parâmetros de acção como: 1) biodiversidade em meios florestais e agrícolas; 2) estabelecimento de uma rede pan-europeia de sítios; 4) espécies invasoras; 5) financiamento da biodiversidade; 6) monitorização da biodiversidade e indicadores; 7) participação e consciencialização públicas.

A base legal de actuação neste contexto é estabelecida principalmente por documentos essenciais como a “Directiva Habitats” e a “Directiva Aves” cujo subproduto essencial foi a criação de uma rede ecológica europeia de áreas com interesse especial de conservação, a “Rede NATURA 2000”. Esta rede é um instrumento de ordenamento do território destinado a ser um pilar básico do desenvolvimento rural e a assegurar a sobrevivência a longo prazo de espécies e habitats mais ameaçados da Europa. Cobre actualmente cerca de 18% do território europeu e é constituída por ZECs (Zonas Especiais de Conservação) e ZPEs (Zonas de Protecção Especial). Em Portugal Continental, esta rede ecológica abrange 29 ZPEs e 60 ZECs / Sítios de Importância Comunitária que compreendem cerca de 20,47% do território nacional (ICN, 2006).

A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) reconhece o valor e a importância da biodiversidade nas suas diversas facetas e considera essencial a conservação através: 1) das suas espécies e da sua diversidade genética; 2) os seus habitats; 3) a conservação do meio ambiente em geral; 4) investimento na comunicação e educação e 5) da monitorização e pesquisa (McNeely *et al.*, 1990; Cuttelod *et al.*, 2009). Este organismo também tem vindo a implementar o sistema de classificação das espécies com base no seu estatuto de conservação perante as ameaças, os Livros

Vermelhos, segundo um conjunto de parâmetros bem definidos (IUCN, 2008; Vié *et al.*, 2009). Nestes documentos reconhece-se, entre outras premissas, a preferência pela utilização de grupos indicadores e a utilização da genética da conservação como ferramenta crucial para a optimização do esforço e implementação de medidas eficazes de conservação.

A IUCN e a Agência Europeia para o Ambiente encaram como principais grupos indicadores no Mediterrâneo os mamíferos, aves, répteis, anfíbios, borboletas, libélulas e peixes de água doce, para travar a perda de biodiversidade (EEA, 2007; Vié *et al.*, 2009). O estabelecimento de grupos indicadores otimiza o esforço nos grupos que se revelam mais informativos face à fragmentação crescente dos habitats, poluição ou alterações climáticas e a genética da conservação lida com os factores genéticos que afectam as populações isoladas, a sua diferenciação intraespecífica e ao nível da comunidade em que se inserem, essenciais para a biologia da conservação e a definição de acções de protecção, translocação de indivíduos ou políticas de valorização (Frankham *et al.*, 2002).

## **1.2 As borboletas como modelos biológicos para a conservação**

Se por um lado os insectos representam o grupo mais bem sucedido de animais na face da Terra, com estimativas que variam entre 2 (estão descritas sensivelmente 1 milhão de espécies, 56% da biodiversidade) e 30 milhões de espécies (Erwin, 1982; Groombridge, 1992), também é incontestável a importância deste grupo na maioria dos processos ecológicos.

Os insectos intervêm em processos fulcrais desde os ciclos tróficos onde constituem a base da cadeia alimentar (e o topo em algumas situações), elementos essenciais na reprodução das angiospérmicas e na reciclagem de nutrientes. Particularmente as borboletas, ao serem uma das ordens mais biodiversas a nível global prestam serviços de ecossistema mais relevantes através da participação como recursos alimentares de vertebrados como aves, morcegos e mamíferos insectívoros e também como polinizadores importantes de angiospérmicas (*p. ex.* Maravalhas *et al.*, 2003).

Dada a abundância de estratégias e a complexidade das interacções que estes mantêm com o meio (Grimaldi & Engel, 2005), é preocupante o facto de que desde a revolução industrial se terão extinguido perto de 11200 espécies de insectos (Mawdsley

& Stork, 1995) e que se perspectiva uma extinção massiva de espécies durante os próximos anos devido às alterações e destruição dos habitats, contaminação ambiental e alterações climáticas de origem antrópica (McKinney, 1999). Pelo menos em território europeu, as borboletas estão a desaparecer a um ritmo mais acelerado que aves ou plantas (Thomas *et al.*, 2004) e apesar do debate gerado, estas constituem um bom grupo indicador, com resultados extrapoláveis para outros grupos (de insectos mas também vertebrados e plantas) onde se verificam lacunas de conhecimento ou há dificuldade de amostragem (Thomas, 2005).

### 1.2.1. Bio-indicação

A perturbação de um determinado habitat irá prejudicar ou alterar a frequência de umas espécies mais do que outras. São usualmente essas espécies mais sensíveis às alterações que despertam maior interesse para a conservação e que se revelam mais úteis na definição das características ecológicas e das suas tendências: os bio-indicadores. Estas espécies podem ser de dois tipos: 1) espécies características, específicas e fiéis a um determinado habitat, com uma baixa plasticidade ecológica adaptadas a condições muito próprias e 2) espécies detectoras, cuja presença é mais alargada ao longo do *continuum* ecológico e o seu estudo a médio-prazo permite inferir sobre a direcção da alteração / perturbação do seu meio (Dufrêne & Legendre, 1997; McGeoch, 1998; McGeoch *et al.*, 2002). Ambos os tipos de bio-indicadores são importantes na definição das condições locais num determinado momento.

Aqui, o papel das borboletas é crucial já que actualmente se apresentam como o grupo de insectos mais bem conhecido a nível global e o único verdadeiramente capaz de ser alvo de monitorização em grande escala por todo o mundo (Brown & Brown, 1992; Ehrlich, 1994). Em virtude da rapidez com que respondem aos fenómenos, as borboletas são alegoricamente comparadas aos canários que eram utilizados nas minas de carvão do Reino Unido durante o séc. XX: em caso de acumulação de gases nocivos, deixavam de cantar e morriam antes que tal acontecesse aos mineiros. Deste modo a alegoria aplica-se no sentido em que as borboletas como grupo indicador respondem mais rapidamente às alterações no seu meio face a uma crise ambiental (Attenborough, 2001).

O conceito de bio-indicação é absolutamente central na biologia da conservação tendo em vista a monitorização de comunidades, a sua evolução e conservação *versus* o delineamento de políticas de ordenamento do território. Recentemente as borboletas



foram consideradas pela Agência Europeia do Ambiente como um dos grupos de indicadores fundamentais (a par das aves) para travar a perda da Biodiversidade até 2010 em território europeu (EEA, 2007).

### 1.2.2. Espécies “guarda-chuva”

O conceito de espécies indicadoras tem um carácter de aviso face às alterações operadas no meio mas para que qualquer medida de conservação surta efeito, torna-se necessária uma optimização dos recursos disponíveis. Assim, surge a conceito de “espécie guarda-chuva” ou *umbrella species*, que tem como base a ideia de que os objectivos da conservação dos habitats se tornam mais eficientes se os poucos fundos disponíveis para esta área forem canalizados para determinadas espécies. Estas destacam-se pela sua importância ecológica por serem muitas vezes essenciais a todo o equilíbrio e sem os quais este se desmorona e por possuírem características ecológicas sobreponíveis com muitas outras da mesma comunidade (*p. ex.* Wilcox, 1984; Usher, 1986). As espécies guarda-chuva apresentam-se geralmente como espécies características dos habitats onde se encontram e não têm que ser obrigatoriamente raras mas a sua conservação proporciona não só a sua sobrevivência como de uma proporção elevada de espécies e interacções associadas ao ecossistema onde estão inseridas.

Neste aspecto as borboletas diurnas preenchem a maioria dos critérios mais importantes para a sua categorização como espécies guarda-chuva (New, 1997a,b):

- 1) Abundância de efectivos em cada população, quando comparadas com vertebrados;
- 2) Grande diversidade específica, muitas limitadas a alguns tipos de habitat;
- 3) Diversidade de estratégias e ecologia mesmo a níveis taxonómicos superiores;
- 4) Grande facilidade de amostragem e estudo *in situ*;
- 5) Grupo bem conhecido taxonomicamente, com um amplo historial de estudo;
- 6) Relativamente rápida resposta às alterações no meio ambiente a diversos níveis, desde as alterações nas comunidades vegetais vs macro-habitat, efeitos do clima vs microclima e mesmo face ao efeito antropogénico sobre o meio.

### 1.2.3. Espécies Bandeira: Um estatuto único entre os insectos

As borboletas diurnas são dos animais mais atraentes e acarinhados pelas suas cores vivas, abundância e conspicuidade onde as escamas que lhes cobrem as asas lhes conferem padrões diversos e complexos, característicos de cada espécie (Nijhout, 1991; Kinoshita & Yoshioka, 2005). O estudo e observação das borboletas é porventura apenas superado pela observação de aves, entre os naturalistas interessados na vida animal e ao contrário do *birdwatching*, o *butterflywatching* está a crescer a um ritmo acelerado (Pyle, 1992).

Este valor estético confere-lhes um potencial comercial e de adesão por parte da sociedade apenas comparável aos grandes mamíferos (New, 1997a,b). Pela atenção que lhes tem sido dada durante as últimas décadas, as sugestões para a sua conservação e gestão dos seus habitats são muitas vezes levadas mais a sério ou têm maior probabilidade de concretização do que as homólogas para outros tipos de insectos.

A imagem das borboletas é utilizada como símbolo da biodiversidade e confere um certo valor natural ao que são associadas, numa multiplicidade de contextos. Contudo, os benefícios directos desta imagem para a conservação das borboletas e dos seus habitats apenas muito superficialmente têm sido capitalizados, isto é, uma imagem que “vende” não está a canalizar financiamento para o estudo e conservação das borboletas, salvo raras excepções como o projecto *Moth Count*, promovido pela ONG britânica Butterfly Conservation e parcialmente financiado pela Heritage Lottery Fund.

No esforço de conservação, uma espécie ideal concilia os três conceitos chave de: 1) representar fielmente o habitat em que se insere, 2) a sua presença e a conservação dos seus habitats permitir que toda uma estrutura ecológica se mantenha e 3) captar o interesse público através de serviços de ecossistema que proporciona directa ou indirectamente (que incluem desde a captação de fundos para a ciência, aproveitamento recreativo, estabilidade ecológica, valor estético *per se*, etc.).

Este potencial torna-as únicas entre os insectos (Samways, 1994; New, 1997b). Enquanto este grupo de importância chave nos ecossistemas responde às alterações climáticas e dos habitats em que se insere com a rapidez dos restantes insectos, a aceitação facilitada por parte da sociedade apenas comparável a grupos carismáticos como os grandes mamíferos ou as aves coloca as borboletas numa posição privilegiada, tornando-as dos melhores embaixadores para a conservação da Natureza, verdadeiras espécies-bandeira ou *flagship-species*.

### 1.3 Filogenética e Conservação

A Biologia da Conservação, como ciência multidisciplinar e fundamental quer para a ciência, quer para o próprio desenvolvimento sustentável, baseia-se em dados precisos de ecologia, fisiologia, biogeografia, sistemática, demografia, marketing e genética (Soulé, 1985).

A Genética da Conservação surge como uma área particularmente significativa na avaliação do grau de isolamento das populações após a fragmentação dos seus habitats e no risco de extinção associado aos fenómenos genéticos como a deriva, perda de diversidade e os efeitos deletérios da consanguinidade. A identificação do valor taxonómico das diferenças em relação às políticas de conservação e a definição de unidades de gestão entre as populações em maior risco e mais carentes de medidas activas de conservação a curto prazo é outra vertente basilar desta área (Frankham *et al.*, 2002).

Assim, uma primeira abordagem às populações de um ponto de vista da biologia da conservação será a investigação da relação taxonómica entre as entidades que compõem a espécie tendo em vista não só medidas de conservação mais complexas a jusante como, através do estudo dos processos que levaram à situação actual, entender melhor os processos biológicos envolvidos na perda ou não de variabilidade genética.

Através de marcadores moleculares o passo seguinte fundamental é a identificação das populações cuja necessidade de conservação é mais premente, o que pode ser alcançado através do estudo da estruturação populacional e da diversidade genética que compõe o caso de estudo. A diferenciação e isolamento genético podem requerer que cada população seja encarada de forma diferente para a conservação, isto é, que seja considerada como uma unidade de gestão diferente.

#### 1.3.1. Análise Filogenética, Taxonomia e Filogeografia

A resolução do estatuto taxonómico das populações é um factor crítico na medida em que se pretende maximizar a manutenção da diversidade genética e evitar a extinção de linhagens com diferentes adaptações locais. O problema reside fundamentalmente no conceito de espécie e na divergência genética ou ecológica a ele associado e não existe um ponto de corte formal a partir do qual uma população diferenciada geneticamente é considerada como espécie ou subespécie distinta, apesar dos esforços desenvolvidos recentemente com a iniciativa do *barcoding* (Herbert *et al.*,

2003). Contudo, mesmo nesta iniciativa que se pretende paradigmática e objectiva há controvérsia nos valores que variam entre 0,32% (Herbert *et al.*, 2004) e os usuais 3% (Herbert *et al.*, 2003) de divergência no fragmento do gene Citocromo-oxidase I (COI) associado ao projecto e a decisão final acaba por ter que ser sempre apoiada em dados ecológicos ou morfológicos (sobre a discussão do tema ver Rubinoff *et al.*, 2006; Silva-Brandão *et al.*, 2009). As questões da taxonomia e da sistemática dos seres vivos têm sido centrais no desenvolvimento da biologia como ciência mesmo antes da teoria da evolução. Se por um lado a maior parte da sistemática de grupos mal conhecidos e hiper-diversos como os insectos e particularmente as borboletas é feita sobretudo com recurso a dados morfológicos, à medida que a sistemática molecular se desenvolve é frequente o aparecimento de posições contrastantes com as ideias pré-concebidas (*p. e.* Herbert *et al.*, 2004; Hundsdoerfer *et al.*, 2005). Neste tema, a iniciativa do *barcoding* em animais pretende, recorrendo à sequenciação de um fragmento do gene COI do ADNmt, estabelecer um sistema semi-automatizado de reconhecimento por distância genética de espécies e formas distintas segundo os pressupostos de grande distância entre espécies diferentes e baixa diferenciação intraespecífica. Actualmente, a melhor abordagem do ponto de vista da sistemática molecular parece ser a sinergia entre a utilização de marcadores moleculares de evolução variável como o ADNmt e marcadores de evolução mais lenta e conservada como os do ADN nuclear assim como a utilização de sequências relativamente grandes (incrementando o número de caracteres em análise) (Wahlberg & Wheat, 2008). Para a definição de novas espécies e a sua articulação com a taxonomia actual sugere-se a abordagem denominada de “taxonomia integrativa” que considera a posição relevante dos marcadores moleculares mas é sujeita ao crivo da análise morfológica e ecológica (Will & Rubinoff, 2004; Dayrat 2005; Will *et al.*, 2005).

Outro ponto forte para a análise molecular aplicada à biodiversidade reside no estudo dos processos históricos que são responsáveis pela distribuição actual de determinada espécie e as suas formas localmente adaptadas, a filogeografia (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). Esta área considera as relações filogenéticas entre os indivíduos e relaciona os fenómenos de diferenciação com os eventos que ocorreram ao nível de clima, geologia e ecologia na elaboração de uma hipótese que explique a distribuição e diferenciação actual dos *taxa*.

O sul da Europa é a região melhor estudada do mundo quanto à filogeografia das suas espécies devido às relativamente recentes convulsões climáticas e geológicas da crise salinica do Messiniano e dos períodos glaciais com sucessivos avanços e recuos de calotes glaciais e isolamento das populações de animais e plantas nas penínsulas Ibérica, Itálica e Balcânica e ilhas mediterrânicas da Córsega, Sardenha, Sicília, Creta e Chipre (*p. e. Cooper et al.*, 1995; Hewitt, 1999; Paulo, 2001; Branco *et al.*, 2002; Hundsdoerfer *et al.*, 2005; López-de-Heredia *et al.*, 2007). Aqui, o Mar Mediterrâneo parece ter desempenhado um papel crucial ao condicionar o movimento da fauna e flora (Hewitt, 2004).

Pelas suas dimensões e heterogeneidade de habitats, a Península Ibérica constitui um dos melhores exemplos da constatação da existência de diferentes refúgios e a manutenção tanto de habitats de fácies fria, pré-alpina, como mediterrânicos mesmo durante estes máximos glaciais (Carrión *et al.*, 2008), o que potenciou a génese de inúmeros endemismos e uma biodiversidade sem paralelo no contexto paleártico ao ponto de ser relativamente comum encontrar linhagens diferentes em muitas espécies apenas no contexto ibérico (Godinho *et al.*, 2003; Bella *et al.*, 2006; Gomez & Lunt, 2007; Schmitt, 2007; Wahlberg & Saccheri, 2007).

### 1.3.2. Estruturação Populacional e Unidades de Gestão para a Conservação

A análise molecular das linhagens dentro de uma espécie permitem-nos inferir, para além das relações filogenéticas, a sua variabilidade genética e assim, implicitamente, a sua capacidade de se adaptar aos sucessivos filtros que ocorrem durante o seu período de vida. A variabilidade genética é portanto, uma medida de adaptabilidade, importante para além do seu valor ecológico: quanto maior a variabilidade numa população, maiores capacidades terá teoricamente de adaptação e as populações de uma espécie poderão estar suficientemente diferenciadas ecológica e / ou geneticamente para necessitarem de diferentes medidas de gestão, especialmente se forem populações pequenas e fragmentadas (Frankham *et al.*, 2002). O grau de isolamento espacial (genético e ou ecológico) entre as populações reveste-se também de maior interesse já que em populações pequenas existe uma maior preponderância dos efeitos estocásticos de deriva e redução de diversidade genética bem como um aumento da consanguinidade.

Neste sentido, o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa (ESU) foi cunhado e desenvolvido para a definição de grupos intraespecíficos prioritários para a

conservação que detivessem atributos genéticos e ecológicos fundamentais para a manutenção futura da espécie como um todo (Crandall *et al.*, 2000; Moritz, 2002). A definição destas unidades é feita tendo em consideração as características ecológicas adaptativas ou genéticas, dando-se especial relevo à conectividade das populações, fluxo genético actual e dimensões do habitat em relação à diversidade genética. A controvérsia deste processo de selecção de valores a conservar tem-se relacionado com a relevância dos marcadores moleculares na sua definição contra a nem sempre análoga diferenciação fenotípica: espécies com uma alta mobilidade (até recentemente) mas cujas populações estão diferentemente adaptadas não irão ser informativas geneticamente ao passo que em *taxa* com um baixo fluxo genético e onde a análise genética confirma a origem da distinção genética por deriva genética poderão ser designadas como diferentes ESU, apesar de não requererem medidas distintas de conservação e poderão mesmo beneficiar de intercâmbio com outras populações.

A delimitação de unidades de conservação e a investigação da estruturação populacional é hoje um conceito fundamentalmente aplicado na escolha informada de populações prioritárias para a conservação e mesmo na complementaridade de estudos filogeográficos e de dinâmica populacional.

## 1.4 Uma espécie emblemática: A Branca-Portuguesa (*Euchloe tagis*)

### 1.4.1. Sistemática e Taxonomia

A Branca-Portuguesa, *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) é uma espécie de borboleta diurna da família Pieridae, subfamília Pierinae e tribo Anthocharidini que inclui as borboletas-da-couve, auroras e afins. Esta família engloba aproximadamente 1100 espécies repartidas por todo o mundo (Robbins, 1982; Ackery, *et al.*, 1999; Vane-Wright, 2003) e compreende actualmente quatro subfamílias distintas (Pseudopontiinae, Dismorphiinae, Pierinae e Coliadinae). Esta subdivisão e a sua filogenia actuais são baseadas em caracteres morfológicos (Klots, 1933; Ehrlich, 1958), bioquímicos (Geiger, 1981) e marcadores moleculares (Braby *et al.*, 2006) (Fig. 2). Estas três abordagens entram em conflito em certos detalhes do posicionamento de algumas linhagens mas a monofilia destas borboletas é suportada por um número elevado de caracteres únicos como a fusão das placas laterais do pronoto, a presença de espinhas bífidas de igual dimensão nos tarsos do primeiro par de patas e pigmentos alares quase únicos entre os Lepidoptera como as pterinas - que se apresentam em inúmeras variantes químicas (Ackery *et al.*, 1999; Wijnen *et al.*, 2007) e conferem a estas borboletas tons geralmente brancos, amarelados ou laranja. A integridade da família Pieridae como grupo natural nunca esteve em disputa ao contrário da maioria das outras famílias.

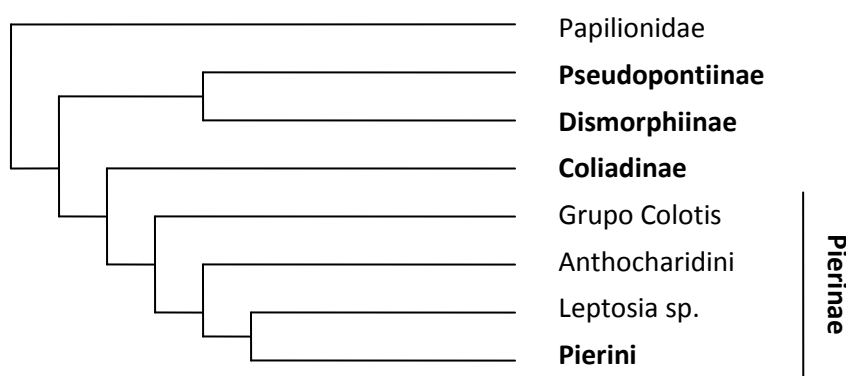


Figura 2: Filogenia da família Pieridae segundo Braby *et al.* (2006). As quatro subfamílias encontram-se realçadas.

Na subfamília Pierinae incluem-se cerca de 840 espécies em 57 géneros distribuídas por todo o mundo e contém espécies de importância económica como as

borboletas da couve (*Pieris spp.*). Esta diversidade de formas abarca cerca de  $\frac{2}{3}$  a  $\frac{3}{4}$  da diversidade na família Pieridae. Apesar de ser tradicionalmente dividida em duas tribos distintas (Anthocharidini e Pierini), dados moleculares apontam para uma maior e mais complexa estruturação da subfamília Pierinae (Braby *et al.*, 2006). Os principais caracteres sinapomórficos compreendem o predomínio da coloração branca e a utilização maioritária de Brassicales como plantas alimentícias (Braby & Trueman 2006).

A tribo Anthocharidini inclui cerca de sete géneros distintos e distingue-se da tribo Pierini pela presença de pupas do tipo I, *sensu* Ackery *et al.*, (1999), isto é, cuja face ventral não se encontra totalmente em contacto com o substrato e possui ao nível da região alar um lobo pronunciado. Este carácter é partilhado com as subfamílias Dismorphinae, Pseudopontiinae e Coliadinae e representa uma plesiomorfia. A sua distribuição é essencialmente Holárctica mas inclui membros na região Afrotropical (*Euchloe spp.*) e Neotropical (*Hesperocharis spp.*). Os géneros mais conhecidos e diversos são Anthocharis (17 espécies) em que existe um marcado dimorfismo sexual possuindo os machos uma característica mancha laranja na região distal da asa anterior e *Euchloe* (25 espécies), em que os machos carecem desse carácter (Fig. 3).

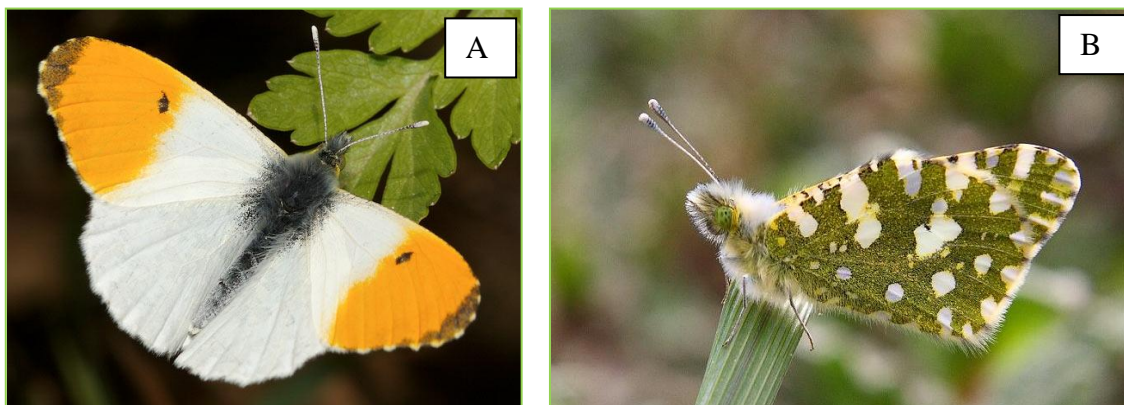


Figura 3: Os dois géneros mais diversos na tribo Anthocharidini; a) *Anthocharis* (*A. cardamines*) (Foto © Luís Ferreira) e b) *Euchloe* (*E. crameri*) (Foto © Eduardo Marabuto).

O género *Euchloe* Hübner, 1819 abrange aproximadamente 25 espécies (Savela, 2009, Ziegler, 2005), disseminadas pelo Paleárctico (21 espécies) e Neártico (7 espécies) onde a sua variabilidade morfológica e comportamental despertou o seu estudo desde muito cedo (Klots, 1930; Bernardi, 1945; Opler, 1966a, b, 1970; Reissinger, 1990; Winhard, 2000). Se por um lado as espécies paleárticas se encontram classificadas em dois grandes grupos distintos (*Euchloe* Hübner e *Elphinstonia* Klots)



(Baker, 1889; Klots, 1930) a corrente actual varia entre a da inclusão destas linhagens diferentes no género *Euchloe*, como dois subgéneros distintos (*p. ex.* Tolman & Lewington, 1997; Savela, 2009), a elevação a géneros diferenciados (De-Gregorio *et al.*, 1992) ou ainda atribuindo ao grupo da *E. tagis* um género aparte (*Iberochloe in* Back *et al.*, 2008). No que se refere às espécies Neárticas, a inclusão do “grupo ausonides” no subgénero *Euchloe* é praticamente consensual já que existem muitos caracteres partilhados em todas as fases do desenvolvimento ao passo que as restantes três espécies são relegadas para uma posição indefinida (Opler, 1974). Actualmente as espécies pertencentes ao género *Euchloe sensu latu* são:

### **Eurásia:**

#### Grupo “*Euchloe*” – borboletas brancas

- Euchloe (Euchloe) ausonia* (Hübner, 1804)
- Euchloe (Euchloe) crameri* Butler, 1869
- Euchloe (Euchloe) simplonia* (Freyer, 1829)
- Euchloe (Euchloe) daphalis* (Moore, 1865)
- Euchloe (Euchloe) pulverata* (Christoph, 1884)
- Euchloe (Euchloe) belemia* (Esper, 1800)
- Euchloe (Euchloe) falloui* (Allard, 1867)
- Euchloe (Euchloe) (crameri) melanochloros* Röber, 1907
- Euchloe (Euchloe) insularis* (Staudinger, 1861)
- Euchloe (Euchloe) orientalis* (Bremer, 1864)
- Euchloe (Euchloe) naina* Kozhantshikov, 1923

#### Grupo “*Iberochloe*”

- Euchloe (Iberochloe) tagis* (Hübner, 1804)
- Euchloe (Iberochloe) (tagis) pechi* (Staudinger, 1885)

#### Grupo “*Elphinstonia*” – borboletas amarelas

- Euchloe (Elphinstonia) charlonia* (Donzel, 1842)
- Euchloe (Elphinstonia) bazaar* Fabiano, 1993
- Euchloe (Elphinstonia) lucilla* Butler, 1886
- Euchloe (Elphinstonia) transcaspica* (Staudinger, 1881)
- Euchloe (Elphinstonia) penia* (Freyer, 1852)
- Euchloe (Elphinstonia) tomyris* Christoph, 1884
- Euchloe (Elphinstonia) lessei* Bernardi, 1957
- Euchloe (Elphinstonia) ziyani* Leestmans & Back, 2001

### **América do Norte:**

#### Grupo “*Euchloe*” – borboletas brancas

- Euchloe (Euchloe) ausonides* (Lucas, 1852)
- Euchloe (Euchloe) creusa* (Doubleday, 1847)
- Euchloe (Euchloe) olympia* (Edwards, 1871)
- Euchloe (Euchloe) ogilvia* Back, 1990

Grupo *incertae sedis*

*Euchloe guaymasensis* Opler, 1986

*Euchloe hyantis* (Edwards, 1871)

*Euchloe lotta* (Beutenmüller, 1898)

A Branca-Portuguesa tem aparecido de certo modo isolada dos outros membros do género, uma vez que possui não só caracteres intermédios entre os subgéneros *Euchloe* e *Elphinstonia* como diferenciados em relação a todas as outras espécies paleárticas, nomeadamente ao nível da coloração, hábitos alimentares e ciclo de vida. Algum debate tem sido gerado quanto ao estatuto de uma das suas populações, *Euchloe pechi* (Staudinger, 1885), que habita localidades isoladas nas montanhas do Atlas da Argélia –ora é elevada ao nível de espécie distinta ora relegada a mera subespécie (Back, 1984; Higgins & Riley, 1986). Recentemente e após uma sumária análise filogenética tanto *E. tagis* como *E. t. pechi* passaram a integrar o género *Iberochloe*, surpreendentemente posicionado como grupo irmão de *Anthocharis* (Back *et al.*, 2008), linha que para já não se segue por uma questão de estabilidade nomenclatural antes que estudos mais sólidos o possam corroborar. Deste modo, relega-se *Iberochloe* a um estatuto infra-genérico de *Euchloe*, à luz da distinção face aos outros membros do género e proximidade morfológica com as restantes espécies no género *Euchloe sensu strictu*.

Assim, o enquadramento taxonómico para esta espécie é o seguinte:

Classe *Insecta*

Subclasse *Dicondylia*

Superordem *Amphyesmenoptera*

Ordem *Lepidoptera*

Superfamília *Papilionoidea*

Família *Pieridae*

Subfamília *Pierinae*

Tribu *Anthocharini*

Género *Euchloe*

(Subgénero *Iberochloe*)

Espécie: *E. tagis* (Hübner, 1804)

#### 1.4.2. Características morfológicas

*Euchloe tagis* é uma pequena borboleta diurna cujo comprimento das asas anteriores varia entre 14 e 22mm. De coloração branca na face superior, quando em repouso e de asas fechadas apresenta-se predominantemente verde no lado inferior (Fig. 4).



Figura 4: Fase adulta de *E. tagis*. a) Face superior; b) Face inferior. (Fotos: © Eduardo Marabuto)

O dimorfismo sexual é reduzido mas ainda assim aparente exibindo as fêmeas maiores dimensões, asas ligeiramente mais largas (menos pontiagudas) e menor contraste na coloração.

Possui um padrão semelhante a outras espécies do género *Euchloe* visto que a maior parte da face superior da asa anterior é de cor branca, destacando-se uma mancha discal negra de formato geralmente rectangular que toca no bordo costal alar e uma extensa mancha apical da mesma cor que encerra completamente um número variável de manchas brancas dispostas ao longo dos espaços s4 e s7 (Higgins & Riley, 1983). A base da asa anterior apresenta ainda uma zona de concentração variável de escamas negras.

A face superior da asa posterior é branca a cinza clara onde apenas se nota o padrão da face inferior, por vezes com pontos pretos onde as veias encontram o bordo alar. A principal diferença face às outras espécies consiste na ausência de um ângulo pronunciado ao nível da veia 8 do bordo costal, sendo em *E. tagis* de curvatura suave.

Na face inferior das asas anteriores o padrão é basicamente semelhante à face superior mas sem a zona escura basal e a região apical das asas ao invés de ser negra apresenta uma cor verde. A mancha discal encontra-se esbatida possuindo muitos exemplares a zona central de cor branca.

A face inferior das asas posteriores é característica nesta espécie em que a cor de base varia entre o verde-seco e o amarelo esverdeado (dependendo da população em

causa) e exhibe diversas pequenas manchas brancas dispersas pela superfície alar. Destacam-se a mancha discal maior e várias manchas ao longo dos pontos de contacto entre as veias e o bordo alar. Estas manchas brancas possuem uma dimensão muito variável entre populações distintas (e mesmo a nível intrapopulacional) podendo estar ausentes (*p. ex. E. t. pechi*) ou ocupar quase toda a superfície alar (*p. ex. E. t. aveyronensis*), sendo este encarado apesar de tudo como o melhor carácter diferenciador entre as diversas populações da Branca-Portuguesa.

### 1.4.3. Biogeografia

A Branca-Portuguesa é uma espécie endémica da região Oeste-Mediterrânica (sensu Dennis *et al.*, 1991, 1998), onde se apresenta em populações dispersas e isoladas desde os Atlas médios e montanhas do Rif em Marrocos (Tennent, 1996; Tarrier & Delacre, 2008) e leste montanhoso da Argélia (*Euchloe (tagis) pechi*, Higgins & Riley, 1987; Tolman & Lewington, 1997), Portugal (Zerkowitz, 1946, Maravalhas *et al.*, 2003), Espanha (Vives Moreno, 1994, Garcia-Barros *et al.*, 2004), Sul e sudeste de França (Lafranchis, 2000) até à região da Toscana no oeste de Itália (Casini, 1993, 1996, 2001). A maior parte das populações encontra-se na Península Ibérica onde a espécie apresenta uma distribuição extensa mas fragmentada (Garcia-Barros *et al.*, 2004) em núcleos mais ou menos isolados por extensas zonas de habitat não adequado.

Enquanto a distribuição europeia da *E. tagis* conhecida até 2003 se encontra representada em quadrículas UTM de 50x50km por Kudrna (2002) (Fig. 5), a sua distribuição ibérica actualizada está representada em Garcia-Barros *et al.* (2004) a uma escala mais fina de quadrículas de 10 km de lado (Fig. 6).

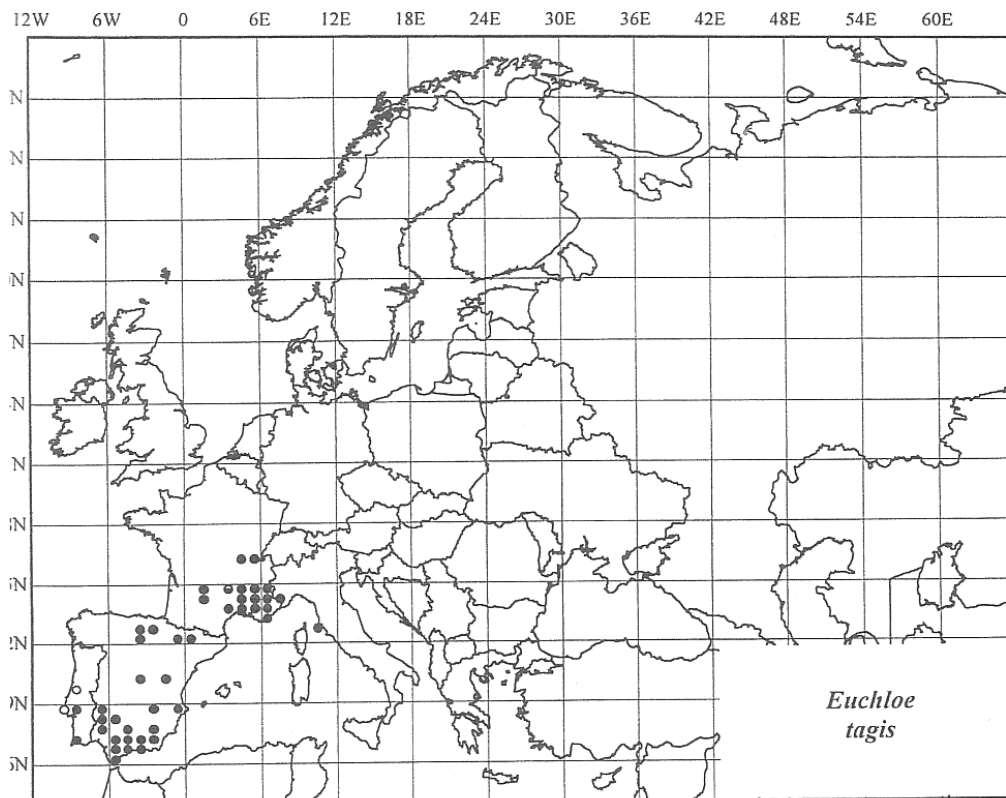


Figura 5: Mapa da distribuição europeia em quadrículas UTM de 50km. Adaptado de Kudrna (2002).

Em Portugal até à realização do presente trabalho, a espécie apenas era conhecida da Serra da Arrábida (Estremadura), não existindo registos recentes da Serra de São Luís (Maravalhas *com. pes.* 2007; Santos Carvalho, *com. pes.* 2008) ou da zona de Leiria e mantinham-se como duvidosos alguns registos do barlavento algarvio (Maravalhas *et al.*, 2003; Garcia-Barros *et al.*, 2004).

A descoberta recente de inúmeras populações em regiões mal exploradas do território espanhol perto de Portugal como a Extremadura (García-Villanueva *et al.*, 1996) e a Galiza (Fernández-Vidal, 1996) anteviam claramente a ocorrência noutros pontos da geografia peninsular, o que se veio a confirmar em território nacional (ver resultados).

A designação comum desta espécie é Branca-Portuguesa ou Tágide em português, Blanca-Portuguesa em castelhano, Portuguese-Dappled-White em inglês e Marbré-Portugais ou Marbré-de-Lusitanie em francês.

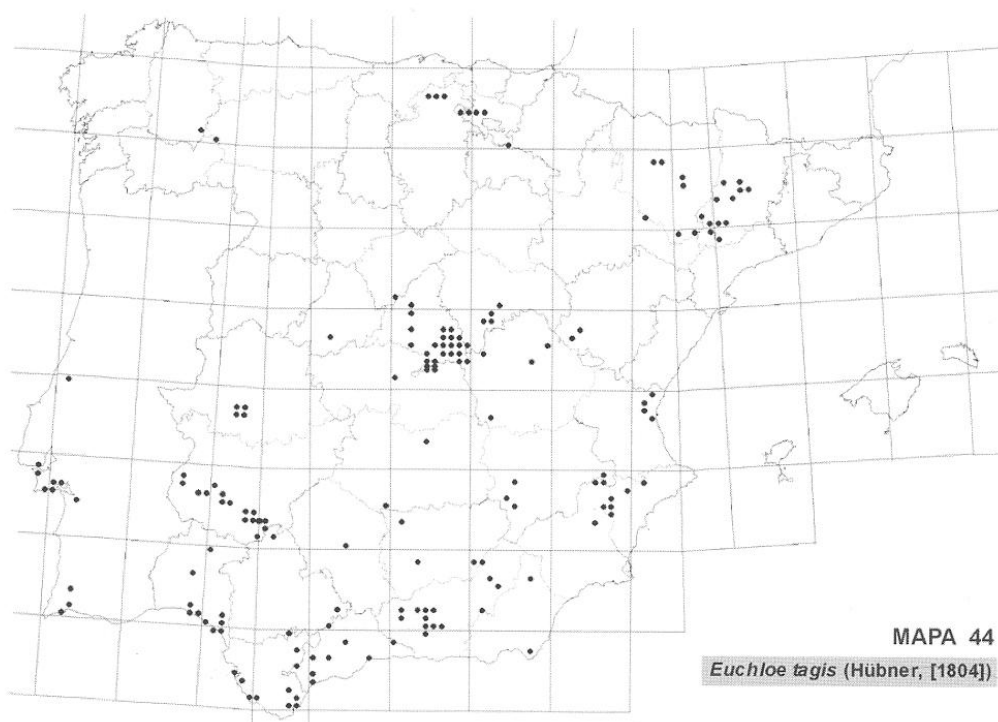


Figura 6: Mapa da distribuição ibérica em quadrículas UTM de 10km. Adaptado de Garcia Barros *et al.* (2003).

#### 1.4.4. Subespécies

Apesar da reduzida área de distribuição, centrada na região biogeográfica Oeste-Mediterrânica, a espécie apresenta-se como muito variável a nível morfológico, quer pelas dimensões dos indivíduos, quer pela existência de diferenças no padrão e coloração alar, o que é até certo ponto corroborado a nível geográfico e reforçado pelo isolamento a que estão sujeitas as suas populações. Foram descritas pelo menos treze subespécies com base nestes critérios:

1 – *Euchloe tagis tagis* (Hübner, 1804): Serra da Arrábida a sul de Lisboa (Portugal), sul de Espanha a oeste de Sevilha. Caracterizada pela coloração verde escura nas asas posteriores e manchas brancas de pequeno tamanho (Vieilledent, 1905; Higgins & Riley, 1983);

2 – *E. tagis bellezina* (Boisduval, 1828): Sul e sudeste de França e Alpes Marítimos (Provença e arredores) para norte até à região de Ain. Tamanho médio, manchas brancas grandes e bem definidas (Bernardi, 1945; Higgins & Riley, *op cit.*).

3 – *E. tagis gallica* (Verity, 1909): Descrita dos Hautes-Alpes, sinonimizada com *E. t. bellezina* por Reissinger (1989)

4 – *E. tagis granadensis* (Ribbe, 1910): Sul de Espanha a leste de Málaga (Cordilheira Bética). Grande variabilidade morfológica mas geralmente intermédia entre *E. t. tagis* e *E. t. castellana* (Olivares & Back, 2004);

5 – *E. tagis castellana* (Verity, 1911): Espanha central a norte da Serra Morena, Madrid e províncias do norte como Lérida e Burgos. *Nomen nudum* (Kudrna, 1983). Pequeno tamanho, padrão bem definido com as manchas brancas nas asas posteriores destacando-se no fundo verde-escuro mas de menor tamanho que em *E. t. bellezina*.

6 – *E. tagis atlasica* Rungs, 1950: Atlas médio marroquino, entre Ifrane e o maciço de Kandar. Padrão semelhante às populações ibéricas como *E. t. tagis* ou *E. t. granadensis* (Tarrier & Delacre, 2008).

7 – *E. tagis davidi* Torrez Mendez & Verdugo Paez, 1985: Litoral de Cádiz e Huelva (Espanha). Distinguida de *E. t. tagis* com base nas grandes dimensões alares das borboletas, distância geográfica e habitat sobre substrato arenoso (Torrez Mendez & Verdugo Paez, 1985). Considerada como pertencendo a *E. t. tagis* por Olivares & Back (2004).

8 – *E. tagis reisseri* Back & Reissinger, 1989: Montanhas do Rif marroquino (Djebel Lakraa, Djebel Tisonka, Chefchaouen). De pequenas dimensões, o padrão alar

nas asas inferiores é praticamente desprovido de manchas brancas, apenas restando a discal e a costal ao nível da v8 (Back & Reissinger, 1989; Tarrier & Delacre, 2008).

9 – *E. tagis calvensis* Casini, 1993: Monte Calvi, arredores de Pisa na Toscana, Itália central. Maiores dimensões que *E. t. bellezina* e com o padrão ligeiramente diferente. Tratam-se de várias populações isoladas entre si, sobre calcários ou serpentinitos (Casini, 1993, 1996, 2001).

10 – *E. tagis piemonti* Back, 2001: Região de Piemonte (p. e. Col de Tende), Noroeste de Itália (Gallo, 1978; Back, 2001);

11 – *E. tagis alhajaræ* Olivares & Back, 2004: Sierra de Aracena (extremo ocidental da Serra Morena) e arredores, até aos 1000m de altitude. As grandes dimensões alares e coloração clara (predominantemente amarela) na face inferior das asas posteriores e tom amarelado na face superior caracterizam esta subespécie (Olivares & Back, 2004);

12 – *E. tagis aveyronensis* Maux & Carsus, 2007: Sudoeste de França, região de Aveyron nos departamentos de Tarn-et-Garonne e Tarn e possivelmente Lot. Similar a *E. t. bellezina* mas de maiores dimensões e as manchas brancas nas asas posteriores ocupam uma maior área, o que confere às asas um tom mais claro (Maux & Carsus, 2007);

13 – *E. (tagis) pechi* (Staudinger, 1885): Lambessa, Batna, Djebel Kaider, Guelt-es-Stel, etc. (Norte da Argélia). Trata-se da população mais diferenciada não possuindo as borboletas quaisquer manchas brancas na zona ventral da asa posterior que é uniformemente verde. Por vezes considerada espécie distinta (Higgins & Riley, 1983; Devarenne, 1990).

Por último, a subespécie que formalmente não existe é *E. tagis salazari* Fernández-Vidal, 1996, citada uma vez do leste da Galiza, extremo oeste de Castela e Leão no norte de Espanha (Fernández-Vidal, 1996) apesar de apelidada não consta da publicação qualquer descrição formal ou representação pictórica da *E. tagis*. Subsequentes expedições ao local descrito pelo autor por parte de Suso Requejo e Rafael Rodrigues (Galiza, Espanha) na época adequada falharam na sua deteção pelo que até ao presente não é possível confirmar a sua existência (Requejo & Rodrigues, *com. pes.* 2009).

Esta profusão de *taxa* torna-se ainda mais difícil de interpretar à luz da área de distribuição reduzida e da pretensa vagilidade associada a um organismo com a capacidade de voo como uma borboleta. Uma vez que até ao presente não existem estudos biométricos ou moleculares centrados na Branca-Portuguesa, é desconhecida a correlação

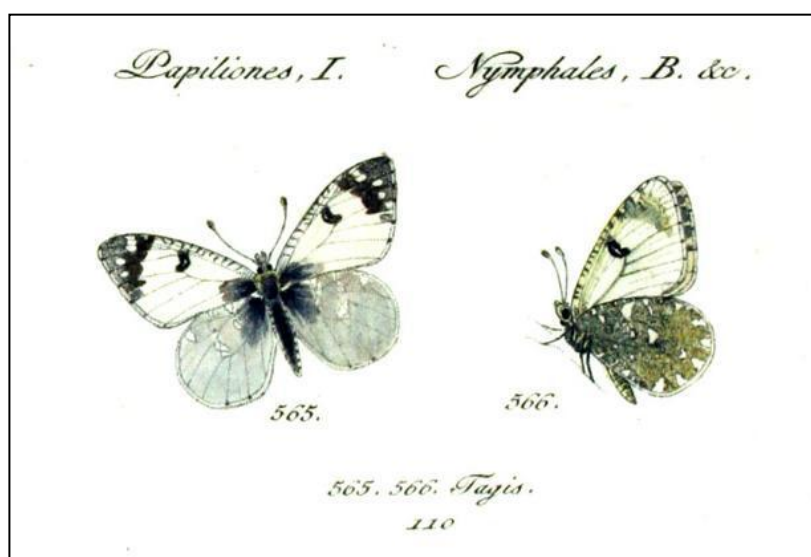


entre a comprovada variabilidade fenotípica e uma hipotética diferenciação genética que apoie ou não a subdivisão taxonómica existente.

#### 1.4.5. História da *E. tagis* em Portugal

Originalmente descrita com base em exemplares portugueses, a *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) foi primeiro capturada pelo conde alemão Johan Centurius von Hoffmannsegg entre 1797 e 1801, sendo cedidos depois a Jacob Hübner que a ilustra e descreve pela primeira vez na sua obra *Sammlung Europäischer Schmetterlinge* (1796-1805). (Fig. 7). Estes primeiros exemplares da nova espécie denominada então *Papilio tagis* terão sido apanhados em “*Piedade near Lisboa*”, segundo Zerkowitz, (1946).

Figura 7: Ilustração original de *Euchloe tagis* por Jacob Hübner na sua obra *Sammlung Europäischer Schmetterlinge* (1796-1805)



Todavia, existem várias localidades contendo o nome “Piedade” nos arredores da capital e perto do rio Tejo como: Quinta da Piedade (UTM 1km: 29SMC9661), Cova da Piedade (29SMC8680) ou Aldeia da Piedade (29SMC9661). Se por um lado a última localidade se apresenta como mais promissora para a ocorrência da espécie dada a sua maior altitude (150m) e proximidade com a Serra da Arrábida, onde se encontra uma das populações conhecidas de *E. tagis*, não está de maneira alguma próxima de Lisboa, especialmente segundo os parâmetros dos finais do século XVIII. A primeira localidade encontra-se na margem norte do rio Tejo, a norte de Lisboa e poderá ter albergado uma população da espécie mas actualmente a inexistência de habitats propícios à sua ocorrência, perdidos para a urbanização, não permite apoiar esta ideia. A segunda localidade encontra-se muito perto do rio Tejo, avistando-se Lisboa e apenas se viu

urbanizada após o êxodo rural do segundo quarto de século do século XX predominando colinas calcárias (Calcário miocénico) e vinhedos em ambiente arenoso até então.

Após a descrição original, apenas se voltou a mencionar a existência da *E. tagis* em Portugal no início do século XX, ocupando altitudes acima dos 300m nas serras da Arrábida e São Luís (Setúbal), às que se adiciona um registo discrepante em Santa Catarina (29SNC1660) (Vieilledent, 1905). Mais tarde, Zerkowitz (1946) menciona Vale do Rosal como localidade para a espécie presumivelmente querendo citar Cândido Mendes de Azevedo mas na referência original (Mendes, 1910) o autor é *taxativo* em que não a observou nesta localidade mas conhecia registos da zona de Alfeite (29SMC8779). Zerkowitz aparentemente também a encontrou na zona de Cacilhas e Almada, localidades referidas no seu trabalho mas não nos de outros autores anteriores e que se encontram de facto muito próximas das já conhecidas Alfeite ou a proposta Cova da Piedade como localidade típica de *Euchloe tagis tagis* (Hübner, 1804).

A proximidade geográfica de todos estes registos históricos em Portugal é notável e a detecção precoce destas populações perto de Lisboa deverá ter tido um papel preponderante na falta de registos em outros locais. Se um lepidopterologista ou coleccionador quisesse observar esta espécie apenas necessitava deslocar-se à zona mais elevada da Serra da Arrábida, facilmente acessível a partir de Lisboa e onde a espécie ainda actualmente se observa com facilidade. Além do mais, uma retrospectiva histórica ao estudo das borboletas em Portugal permite verificar que a maioria dos estudos se centrou na metade norte do país, onde não existem manchas extensas de habitat para a espécie (Maravalhas *et al.*, 2003), o que certamente limitou a sua detecção noutros locais.

No final do século XX, apenas eram conhecidos os registos históricos supracitados da zona de Almada, Cacilhas e Alfeite, históricos e contemporâneos da Serra da Arrábida e São Luís além de outros surgidos mais recentemente, do Barlavento Algarvio (Corley *et al.*, 2000; Garcia-Barros *et al.*, 2004). Estes últimos reportam a observações que não recorreram à captura dos indivíduos em causa e nunca puderam ser confirmados. Por fim, existe ainda um registo solitário da região de Leiria que corresponde a um exemplar no Museu de História Natural da Faculdade de Ciências do Porto capturado por Maria Amélia da Silva Cruz e rotulado como “*Euchloe tagis bellezina*” (Garcia-Barros *et al.*, *op. cit.*; Bívar de Sousa, *com. pes.*, 2008).

A espécie era portanto considerada muito rara em Portugal e foi-lhe atribuído o estatuto de “Em Perigo” aquando da publicação do livro “As Borboletas de Portugal” (Maravalhas *et al.*, 2003).

#### 1.4.6. Ciclo de vida

O ciclo de vida da *Euchloe tagis* desenrola-se ao longo de uma única geração anual em que os adultos voam geralmente de Fevereiro (Janeiro) a Maio (Junho), dependendo do local e população (Higgins & Riley, 1983; Tolman & Lewington, 1997), ao contrário das outras espécies do género com que comparte a área de distribuição, que são bivoltinas.

A fase larvar tem lugar durante aproximadamente duas semanas na segunda metade do período de voo dos adultos (entre Abril e Junho) nas partes superiores das plantas alimentícias, crucíferas maioritariamente do género *Iberis* (Assembleias) mas também *Biscutella laevigata* e *Eruca vesicaria* (Verity, 1947; Aizpúrua, 1988; Olivares & Back, 2004). É na fase de pupa que a restante parte do ano é passada, emergindo o adulto na Primavera seguinte. As fases pré-imaginais foram ilustradas e descritas globalmente por diversos autores como Huertas-Dionisio (1986), Aizpúrua (1988), Casini (1996) e Olivares & Back (2004) de onde se adaptaram os parágrafos seguintes:

##### **Ovo**

Apresenta a forma típica dos Pierinae, de meio-fuso / bala e densamente estriado longitudinalmente, a sua orientação é perpendicular ao plano do substrato e é colocado isoladamente nas partes terminais da planta alimentícia como folhas jovens ou botões florais. De acordo com a população, pode ser encontrado de Março a Maio e a coloração inicialmente branca ou amarelada passa a laranja ao final de algumas horas. Tanto a forma como as dimensões são semelhantes às outras espécies simpátricas do género *Euchloe*, aproximadamente 1x0,5mm (Fig. 8).



Figura 8: Ovo de *E. tagis* sobre *Iberis*. (Foto: © Eduardo Marabuto)

### **Larva**

A lagarta de primeiro instar (L1) apresenta-se com uma coloração amarelada salpicada de pontos negros que correspondem às sedas e se destacam nesta fase. A cápsula cefálica é castanho-escuro. Alimenta-se na zona terminal dos ramos, particularmente na umbela e nos pedúnculos florais.

A lagarta de último instar (L5) mede entre 26 e 28 mm e tem coloração de fundo verde clara, estando ausente qualquer linha dorsal mas destacando-se uma linha pleural lateral de cor branca bem marcada acompanhada na sua parte superior por uma linha rosa-choc (Fig. 9). Tanto as patas verdadeiras como os pseudópodes são de cor verde e a cápsula cefálica é homocromática com o resto do corpo. Todo o corpo é coberto de sedas muito curtas de cor negra cuja densidade hipoteticamente varia com a população em consideração. As antenas apresentam uma coloração um pouco mais escura que a restante estrutura. Como carácter diferencial entre as diversas populações alguns dos autores supracitados realçam o facto de as lagartas aceitarem ou não folhas como alimento, dado ser conhecida a preferência pelas estruturas florais. (p. e. a aceitação destas por parte de *E. t. calvensis* contra *E. t. piemonti* in Casini, 1996 e Jutzeler, 1993).

A coloração da lagarta da Branca-Portuguesa é ímpar quando comparada com as restantes espécies paleárticas do género *Euchloe* e apenas se assemelha à apresentada por algumas espécies americanas (*Euchloe hyantis*, *E. lotta*, *E. guaymasensis*; Anexo

XI, Fig. 39) ainda não formalmente incluídas em qualquer dos subgéneros actuais pelo que levanta interessantes questões do ponto de vista filogenético. Principalmente relevantes serão as diferenças em relação à espécie paleártica com a qual tem muitas vezes sido comparada, *Euchloe insularis* (Staudinger, 1861), endémica da Córsega e Sardenha, que apesar das semelhanças na fase adulta, dever-se-à encontrar filogeneticamente mais próxima de espécies como *E. ausonia* e *E. crameri*, o que é claramente apoiado pela morfologia da fase larvar (Jutzeler *et al.*, 1996). Ainda, dado que alguns autores enaltecem a existência de diferenças morfológicas ao nível da fase de lagarta entre várias populações da *E. tagis*, (*p. ex.* Casini, 1996) será porventura um factor importante a ter em conta numa análise diferencial e filogeográfica em Portugal e a nível Europeu.



Figura 9: Lagarta de *E. tagis* em 5º instar (final). (Foto: © Eduardo Marabuto)

### **Pupa**

Após a conclusão do período de alimentação, as lagartas em L5 experienciam uma alteração na coloração de fundo que passa a carmim. Este padrão de alteração de cor é semelhante à maioria das restantes espécies no género *Euchloe* (Opler, 1974). De seguida deixam de comer e procuram um local para a ecdise.

A pupa é do tipo I (Ackery *et al.*, 1999), de coloração castanho-clara a branco-acinzentada onde se destaca a região cefálica afilada, uma linha dorsal negra entre o primeiro segmento torácico e o oitavo segmento abdominal. Mede aproximadamente 21x3,4mm (Fig. 10) e é semelhante às espécies simpátricas do mesmo género, *Euchloe belemia* e *E. crameri* (Huertas-Dionísio, 1986).

O insecto passa o resto do ano nesta fase, até à emergência na Primavera do ano seguinte ou pode permanecer assim durante vários anos até as condições se apresentarem favoráveis (Huertas-Dionísio, 1988), factor importante ao ser abordada a resiliência face a fenómenos ambientais, abundância em determinados anos e mesmo conservação.



Figura 10: Pupa. (Foto: © Eduardo Marabuto)

#### 1.4.7. Ecologia

##### **Plantas alimentícias**

Desde o início do estudo da Branca-Portuguesa que se constatou uma componente importante na sua biologia que a distingue de outras espécies de ocorrência simpátrica: a sua aparente incapacidade de explorar uma ampla gama de espécies de plantas da família Cruciferae e de se cingir maioritariamente ao género *Iberis*, plantas denominadas por Assembleias (Fig. 11) quando em condições naturais (mas ver Caballero, 1996).

Como nas restantes espécies do género *Euchloe*, as plantas alimentícias utilizadas são função da escolha efectuada pelas fêmeas aquando da oviposição (Opler, 1974) e seguramente da capacidade de cada população de borboleta em ultrapassar as defesas químicas dessa espécie de planta.

Assim, embora *E. tagis* esteja referida ocasionalmente sobre *Biscutella* ou *Eruca vesicaria* (Verity, *op cit.*; Olivares & Back, *op cit.*), a maioria dos estudos reportam a inúmeras espécies perenes no género *Iberis*: *Iberis amara*, *I. atlantica*, *I. ciliata*, *I. grosmiqueli*, *I. linifolia*, *I. odorata*, *I. pinnata*, *I. saxatilis*, *I. sempervirens* e *I. umbellata* (Verity, 1947; Higgins & Riley, 1983; Aizpúrua, 1988; Casini, 1996; Olivares & Back, 2004; Tarrier & Delacre, 2008).



Figura 11: *Iberis ciliata contracta*. (Fotos: © Eduardo Marabuto)

O género *Iberis* possui o seu centro de diversificação mundial na Bacia Mediterrânica, sendo conhecidas aproximadamente 30 espécies, 20 das quais em território europeu (Da Silva & Franco, 1993). A Península Ibérica, como se poderá depreender pelo restritivo genérico é uma área de diversificação importante já que aí

habitam cerca de 16 espécies distintas que por sua vez se subdividem em vários *taxa* infraespecíficos (Moreno, 1997).

Apesar da distribuição destas plantas não ser inteiramente conhecida, sabe-se que estão geralmente associadas a solos leves básicos ou de origem calcária pelo que esta é uma característica importante quer na biogeografia da *E. tagis*, quer no delineamento de estudos que a visem e aos seus habitats.

É devido a esta preferência ecológica que Portugal apresenta apenas um quinto das espécies ibéricas de Assembleias, com cinco *taxa* (3 espécies): *Iberis ciliata contracta*, *Iberis ciliata welwitschii*, *Iberis procumbens procumbens*, *Iberis procumbens microcarpa* e *Iberis pectinata* (Franco, 1971; Moreno, 1997). Enquanto *I. ciliata welwitschii* e *I. procumbens procumbens* se encontram distribuídos por ecossistemas dunares litorais ou sub-litorais, *I. ciliata contracta*, *I. procumbens microcarpa* e *I. pectinata* ocorrem em zonas rochosas de carácter básico ou calcário. Com excepção de *Iberis pectinata*, cuja distribuição é bem conhecida e exígua em território nacional (Moreno, 1997), todo o conhecimento ao nível da cartografia e distribuição dos restantes *taxa* se encontra disperso pelos inúmeros trabalhos de carácter local, apesar de *I. p. microcarpa* ser de conservação prioritária (Walter & Gillet, 1997; Decreto-Lei 140/99 – Anexos B-II-b e B-IV-b) e de um modo geral estas espécies ocuparem áreas com uma elevada biodiversidade, em muitos casos com estatuto de protecção.

Uma noção consistente do espaço multidimensional biológico ocupado por *E. tagis* nos ecossistemas em Portugal e a predição fundamentada da sua distribuição presente e futura passará obrigatoriamente pela obtenção de mais dados sobre a distribuição, requisitos ecológicos e vulnerabilidade das diversas espécies de Assembleias.

### **Habitats**

A *Euchloe tagis* é uma espécie ecologicamente algo exigente pelo que se comporta como calcícola, maioritariamente associada a habitats de fácies basófilo (pH > 7) cujo substrato é rico em cálcio e / ou magnésio (Casini, 2001; Olivares & Back, 2004). Exemplos incluem as formações de rochas carbonatadas de calcários, dolomitos, gessos ou mármore, ocorrendo também, ainda que mais raramente, em zonas arenosas perto da costa ou sobre serpentinitos (Casini, 2001). A geomorfologia das áreas colonizadas por esta espécie é característica, correspondendo tradicionalmente a elevações rochosas de baixa a mediana altitude em território europeu (<1000m) e acima



dos 1400m no Norte de África, sejam estes sistemas montanhosos sub-litorais (Alpes marítimos, Serra da Arrábida, Gibraltar) ou relevos residuais que se destacam no envolvente plano (como as serras espanholas a sul da província de Badajoz).

Ao nível do clima e vegetação, os habitats onde ocorre enquadram-se de uma forma geral nos andares Termo e Mesomediterrânico na Europa e Supramediterrânico no Norte de África e são usualmente preenchidos por matagal mediterrânico basófilo, correspondendo às etapas sub-seriais do carvalhal esclerófilo climácico (*Quercetea ilicis*) onde as plantas alimentícias exclusivas, as Assembleias (*Iberis* spp., Família Cruciferae), se desenvolvem nas clareiras e fissuras das rochas. Esta espécie está especialmente associada a áreas mais abertas e rochosas destes habitats, as garrigues (Santos Carvalho com. pes. 2009) e no centro de Espanha encontra-se particularmente associada às etapas mais desenvolvidas do matagal, nomeadamente em áreas de azinhal e carrascal (Viejo Montesinos, 1986).

Estes habitats são também importantes reservatórios de biodiversidade a vários níveis ao permitirem a sobrevivência de uma fauna (morcegos, algumas espécies de aves, moluscos e inúmeros artrópodes) e flora (no Sul da Europa, especialmente orquídeas) especificamente calcícola. Com uma elevada taxa de endemismos (WWF & IUCN, 1994; Vermeulen & Whitten, 1999), são considerados prioritários no espaço europeu (Rede Natura 2000).

Um factor a ter em conta na sua detecção é a congregação de ambos os sexos no alto das elevações de terreno, usualmente linhas de cumeada e colinas; fenómeno conhecido por *hilltopping* e amplamente descrito em inúmeras espécies de borboletas (Scott, 1968) pelo que a espécie é difícil de detectar fora destes locais (*obs. pes.*).

Apesar de tudo, este estudo pretende elucidar sobre algumas questões mais específicas como: Que recursos são essenciais e constituem o habitat da *E. tagis* e que usos do solo são compatíveis com a sua manutenção? Que espécies estão usualmente presentes e como os caracterizar? Será que *E. tagis* utiliza todas as fontes de néctar ou todas as plantas alimentícias à sua disposição?

### **Interacção com outras espécies**

A existência de parasitóides desta espécie apenas foi superficialmente abordada em Huertas-Dionisio (1986) que menciona que “(a pupa) está às vezes muito parasitada por Hymenoptera.” mas até ao presente não se encontra referida qualquer espécie em particular, possivelmente quer pelos escassos estudos feitos sobre os estádios imaturos

da *E. tagis* quer pela dificuldade da sua detecção na Natureza ou mesmo a dificuldade na identificação de muitos dos grupos de parasitóides de Lepidoptera como os Tachinidae (Diptera) ou Hymenoptera, Parasitica. Mesmo ao nível genérico, o conhecimento dos parasitóides pode considerar-se residual e apenas a espécie generalista *Phryxe nemea* (Meigen, 1824) (Diptera, Tachinidae, Exoristinae) é conhecida por atacar *Euchloe ausonia* (Ford *et al.*, 2000).

A utilização quase exclusiva de plantas do género *Iberis* pela Branca-Portuguesa parece evitar uma competição muito intensa por parte de outras espécies de Lepidoptera. Contudo, outra espécie relacionada, *Pieris manni* (Mayer, 1851) também utiliza quase exclusivamente as Assembleias e a competição directa é apontada como uma das causas da escassez de exemplares numa das populações andaluzas de *E. tagis* (Olivares & Back, 2004) apesar de tal não ter sido efectivamente testado. Essa tese deverá demonstrar-se pouco sólida uma vez que as duas espécies apresentam-se em diferenciadas guildes ecológicas: enquanto *P. manni* é folívora, *E. tagis* alimenta-se ao nível da inflorescência e a competição entre estes dois grupos de espécies é mínima (*p. ex.* Courtney & Chew, 1987).

Muitas espécies de Pieridae, particularmente as que se alimentam nas inflorescências apresentam comportamentos agressivos para com outras que ocorram na mesma planta, sendo o canibalismo um fenómeno recorrente (Courtney & Chew, 1987). Assim, a competição poder-se-á revelar importante para a prevalência de *E. tagis* em determinada área apesar de até ao presente não se saber se se trata de uma espécie que desenvolve comportamentos canibais ou não e qual a sua susceptibilidade a outras espécies simpátricas, ao que se pretende responder com este estudo.

#### 1.4.8. Conservação

*Euchloe tagis* mantém-se como uma espécie pouco conhecida em relação a muitos aspectos do seu ciclo de vida, distribuição e ecologia pelo que até ao presente, também aspectos ligados à sua conservação têm sido abordados com alguma superficialidade e assim, deverão ser interpretados com cautela. Contudo, dadas as suas especificidades ecológicas é amplamente considerada uma espécie pouco comum e vulnerável aos muitos factores de coacção que existem sobre os seus habitats em toda a sua área de distribuição.

Se por um lado algumas populações apresentam efectivos populacionais regularmente abundantes, outras parecem ter experimentado grandes declínios num passado recente ou mesmo ter-se aproximado de condições de extinção ou pré-extinção.

No Livro Vermelho das Borboletas Diurnas Europeias (Van Swaay & Warren, 1999) a Branca-Portuguesa é classificada como não prioritária com base no critério de não exclusividade (ou quase exclusividade) no território europeu (distribuição de tipo 2, sensu Kudrna, 1986), apesar de ocupar uma área de apenas 1-5% do território. Tal revela-se incorrecto na medida em que a maioria das suas populações estão de facto em território europeu e as populações africanas ocupam uma área de distribuição exígua (Tennent, 1996; Tarrier & Delacre, 2008) e claramente periférica. Em virtude deste facto, justificar-se-ia a atribuição de uma distribuição de tipo 3 a qual iria conferir à *E. tagis* um estatuto de conservação de pelo menos SPEC4b (“espécies cuja distribuição global está concentrada em território europeu mas não são consideradas ameaçadas nem a nível global nem europeu”).

Mais recentemente, no Atlas de Risco Climático das Borboletas Europeias (Settele *et al.* 2008), *E. tagis* é apresentada como muito vulnerável às alterações climáticas previstas em todos os cenários apresentados (categoria HHR) dado a sua distribuição actual ser bem explicada por variáveis climáticas (AUC= 0,86). Prevê-se uma variação no desaparecimento da sua área actual de ocorrência entre -18,72% no melhor dos cenários em 2050 e uns alarmantes -87% em 2080, no o pior cenário.

A Branca-Portuguesa é apresentada como de importância fulcral para a conservação dos seus habitats em Marrocos. A sua situação especialmente dramática em que muitas das populações já originalmente marginais e altamente localizadas devido a restrições geológicas e climáticas estão extintas ou extraordinariamente ameaçadas (*p. ex.* a considerada extinta subespécie *E. t. atlasica* na região de Ifrane) aliada à crescente desertificação de origem antrópica (manifestada sobretudo pelo sobre-pastoreio e erosão

dos solos) é no entanto um factor a ter em conta. As populações da zona do Rif (*E. t. reisseri*) encontram-se menos vulneráveis pela inacessibilidade e maiores dimensões do habitat apesar de nunca ser uma espécie comum. Actualmente é considerada uma espécie bio-indicadora de primeira ordem e a sua mera presença exige medidas proactivas de conservação e de gestão (Tarrier & Delacre, 2008).

Em Espanha, onde a maior parte das populações podem ser observadas, *E. tagis* encontra-se largamente distribuída e globalmente não parece estar ameaçada. Apresenta-se como uma espécie muito mais difundida do que no Norte de África, ocorrendo desde o nível do mar até aos 1800m numa variedade de habitats sob substrato básico. Contudo, algumas populações na orla Mediterrânica têm sido alvo de pressões muito elevadas pela destruição dos habitats para a agricultura, pastorícia e urbanização galopante estando seriamente ameaçadas de desaparecimento (Olivares & Back, 2004).

Em França as populações de *E. tagis* são discretas apesar de presentes numa grande área que se estende desde os Alpes marítimos e região fronteiriça com Itália, o vale do Ain e toda a Provença, mas os efectivos populacionais são escassos e a espécie nunca é comum (Boyer, *com. pes.* 2008). Apenas uma das populações (*E. t. aveyronensis*), embora ocupe uma pouco extensa área de distribuição, não parece apresentar problemas de conservação (Maux & Carsus, 2007).

Em Itália as populações de *E. t. calvensis* encontram-se fragmentadas ao longo do litoral da Toscana em ilhotas de habitat favorável cuja dimensão é variável mas sempre reduzida, entre a povoação de Massa e o Monte Calvi, não sendo no entanto uma espécie rara nos locais adequados e na altura ideal (Casini, 2001).

Finalmente, em Portugal apenas cerca de trinta lepidopterologistas viram, até ao momento, exemplares provenientes da Serra da Arrábida (Maravalhas, *com. pes.*) e esta é considerada, pela escassez de registos oficiais e limitada distribuição como “Em Perigo de Extinção” (Maravalhas, 1999; Maravalhas *et al.*, 2003), apontando-se como causa importante do seu suposto declínio a ocorrência de incêndios florestais no Parque Natural da Arrábida. Não foi realizado qualquer estudo sobre as preferências ecológicas em Portugal ou a transposição dos princípios da IUCN para a inclusão num Livro Vermelho dos Invertebrados de Portugal pelo que o estatuto acima considerado para esta espécie apenas se baseia em dados empíricos e fragmentários.

A conservação apoia-se em dados muito precisos como a abundância a nível local e global, as tendências demográficas, a variabilidade genética e a importância da espécie para o funcionamento do ecossistema em que se insere e o seu valor estético.

Por serem elementos-chave nos ecossistemas, estarem tão ameaçadas e devido ao seu valor estético, as borboletas são consideradas dos melhores representantes da conservação da Natureza e bons indicadores ambientais (Pollard & Yates, 1993; New, 1997a,b).

O estudo abrangente desta espécie a nível ecológico e molecular abre novas portas para a sua compreensão e dos biótopos associados, possibilitando o delineamento de planos de conservação específicos aplicados às diversas populações desta borboleta, que se poderá apresentar como indicadora de qualidade ambiental. Não só é fundamental para a sua conservação identificar as populações que se encontram em maior risco e com uma menor variabilidade genética, como também desenvolver os mecanismos subjacentes à sua aceitação como uma putativa “espécie guarda-chuva” (New, 1997b) de ecossistemas ameaçados na Europa e Norte de África. Desta forma, contribuir-se-á também para a conservação de outras espécies menos carismáticas presentes nos mesmos habitats.

## 1.5 Objectivos

Este estudo abrange áreas diversificadas do conhecimento sobre a espécie de borboleta *Euchloe tagis*, os seus habitats e a conservação de ambos. Assim, pretende-se obter conhecimentos que abrangem desde a biologia e ecologia desta espécie singular em Portugal à filogeografia e estruturação populacional a uma escala maior abrangendo a sua área de distribuição mundial. Finalmente, num plano taxonómico pretende-se confrontar o uso de características morfométricas e o uso de marcadores moleculares na obtenção de uma hipótese explicativa para a grande amplitude de variação fenotípica que deu origem à profusão de *taxa* infra-específicos surgidos desde a sua descoberta no século XVIII em Portugal.

Sucintamente pretende-se:

- Partindo de uma base que inclui as preferências ecológicas da Branca-Portuguesa, determinar a sua distribuição aproximada em Portugal;
- Aprofundar o conhecimento do ciclo de vida, comportamento e morfologia das populações de *E. tagis* em Portugal, dado que este é virtualmente nulo;
- Analisar a história filogeográfica da Branca-Portuguesa e a sua relação com os grandes eventos de alterações climáticas e ecológicas ocorrentes no passado e a taxonomia actual, recorrendo a marcadores moleculares que explicam bem este tipo de variação temporal, como o ADN mitocondrial;
- Determinar a estruturação populacional da *E. tagis* a nível genético e daí tirar ilacções do ponto de vista de conservação a nível nacional e internacional;
- Propor medidas para uma conservação eficaz da espécie em Portugal, lançando as bases para a elaboração de um plano de Acção de Conservação sobre a Branca-Portuguesa, espécie de distribuição restrita, possível indicadora de qualidade ecológica e espécie guarda-chuva.

## METODOLOGIA

Este trabalho, pela sua abrangência temática envolveu: 1) detecção, recolha no campo e estudo de exemplares da espécie *Euchloe tagis*, 2) seguimento do desenvolvimento em cativo dos estádios pré-imaginais e 3) análise genética em laboratório, terminando com a análise dos dados obtidos. Apesar de se ter centrado fundamentalmente em Portugal, também se considerou importante a obtenção de dados (nomeadamente exemplares) nos restantes países da área de distribuição da espécie.

### 2.1 Trabalho de campo e recolha de amostras

Tendo presente a ideia de que a Branca-Portuguesa é uma espécie pouco conhecida e cuja distribuição na Península Ibérica tem um carácter fragmentário com as populações extremamente isoladas umas das outras e se perspectivava a existência de mais populações portuguesas do que as identificadas (Garcia-Villanueva *et al.*, 1997), a primeira abordagem consistiu na tentativa de detecção de novas populações em Portugal. Para o efeito, consideraram-se vários factores conhecidos por influenciar positivamente a presença desta espécie como:

- 1) Presença ou ausência de plantas alimentícias. Como referido na Introdução (Capítulo 1.5.7), *Euchloe tagis* é uma espécie praticamente monófaga em espécies de crucíferas do género *Iberis*. A consulta bibliográfica visou a elaboração de um mapa de distribuição das espécies portuguesas deste género ao nível de quadrículas de 10km de lado na projecção cartográfica de UTM. Estes dados foram complementados com prospecções de campo *ad hoc* e dados não publicados fornecidos por especialistas e naturalistas.
- 2) Composição geológica. Outro factor crucial para a ocorrência de *Euchloe tagis* é a ocorrência de solos de origem sedimentar com uma grande concentração de cálcio e / ou magnésio, nomeadamente calcários sedimentares ou cristalinos ou serpentinitos com elevado pH (>8) pelo que se procurou a cartografia também deste tipo de substrato.
- 3) Estado de conservação dos habitats potenciais e sua dimensão. A um nível mais local que os outros dois factores, a prospecção incidiu nas áreas onde o coberto

vegetal se aproximava mais das etapas avançadas de sucessão das comunidades vegetais locais. Assim, em áreas que conjugavam a presença de calcários com as plantas alimentícias, privilegiou-se a existência de vegetação bem desenvolvida dentro das séries de vegetação características da zona. Dado que por vezes as manchas de calcários se encontram muito localizadas e ocupam uma área reduzida, também se intensificaram esforços em áreas maiores, onde a probabilidade de albergarem populações quer de *E. tagis* ou de *Iberis spp.* seria maior.

Com a conjugação destes três factores procurou-se obter um mapa de Portugal com as quadrículas de resolução de 10km de lado onde seria mais provável a detecção de *Euchloe tagis* para facilitar o esforço de campo.

O material para este estudo foi recolhido pelo autor em saídas de campo que tiveram lugar em Portugal e Espanha ou recolhidos por colegas entre as Primaveras de 2007 e 2009. Após a recolha, a cada exemplar fresco foram retiradas duas patas para análise genética e colocadas em frascos contendo etanol a 100% e mais tarde guardadas no congelador a -20°C. As borboletas foram em seguida montadas com as asas abertas ou em envelopes específicos para posterior montagem e tanto estas como as suas patas anteriormente removidas foram codificadas e individualmente numeradas. Cada exemplar foi georreferenciado e integrado numa base de dados.

Os mapas de distribuição foram obtidos com recurso ao software DMAP 7.2®.

## **2.2 Desenvolvimento em cativeiro**

Para o estudo do desenvolvimento pré-imaginal em *Euchloe tagis* procedeu-se à recolha no campo de exemplares imaturos que foram levados para o laboratório. Por outro lado, também se procurou obter estas fases através da captura de fêmeas vivas que viriam a pôr ovos em cativeiro. O desenvolvimento larvar foi levado a cabo nos laboratórios da Faculdade de Ciências de Lisboa.

As plantas alimentícias constantes em cada local onde foram detectados estádios pré-imaginais (ou se conseguiu a sua obtenção via fêmeas capturadas) foram envasadas e serviram de alimento à fase larvar no laboratório. O fotoperíodo foi igual ao registado



em meio natural já que os vasos com Assembleias foram sujeitos propositadamente apenas ao efeito da luz natural.

Todos os estádios de desenvolvimento foram fotografados com uma máquina fotográfica CANON EOS 350D com lente macro SIGMA 105mm e medidos antes da ecdise bem como se procedeu ao registo do tempo decorrente em cada fase. Por fim, observações *ad-hoc* permitiram tirar notas sobre o comportamento destas fases.

## 2.3 Análise genética

Para a análise genética e como anteriormente referido, foram utilizadas apenas duas patas de cada exemplar. Pretendia-se sequenciar uma secção variável do genoma da Branca-Portuguesa e espécies aparentadas afim de responder às questões já colocadas (Capítulo 1.5).

O ADN foi extraído e isolado do restante material biológico recorrendo ao kit comercial de extracção E.Z.N.A Tissue Isolation Kit® (OMEGA bio-tek) e segundo um protocolo para tecido ligeiramente modificado (Anexo XX). Os resultados da extracção de ADN foram verificados por electroforese em gel de Agarose corado com brometo de etídio.

### 2.3.1. Selecção de genes para análise.

O nível de detalhe na informação pretendida exige a utilização de um marcador molecular com uma elevada resolução a uma escala temporal recente, i. e. com uma evolução relativamente rápida.

A escolha recai sobre o ADN mitocondrial (ADNmt) por inúmeras razões que incluem a sua relativamente curta mas estável estrutura molecular, ausência de recombinação por ser transmitido apenas pelas fêmeas e por estar presente abundantemente na maioria das células do organismo (Avice, 2000). Assim, os genes mitocondriais são especialmente adequados em estudos sobre espécies estreitamente relacionadas e ao nível intra-específico. Estes alteram-se a uma *taxa* superior à dos genes nucleares (1 a 2 vezes superior em insectos Hey, 1994) e apresentam um tempo de coalescência mais curto em virtude de apresentarem um menor efectivo populacional (1/4 da dimensão dos genes autosómicos). Estas características tornaram o ADNmt o principal marcador na resolução de padrões geográficos na distribuição das espécies

(Awise *et al.*, 1987; Hewitt, 1996), filogenias em grupos muito aparentados e mais recentemente na identificação de espécies pela atribuição de códigos de barras genéticos, o *barcoding* (Herbert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2005). Contudo, esta molécula não está isenta de polémica e os dados apontam para a necessidade de precaução na análise dos dados obtidos. Se por um lado a evolução do ADNmt não reflecte obrigatoriamente a evolução do genoma ou a história populacional (Ballard & Whitlock, 2004), também as outrora premissas de neutralidade (Ballard & Rand, 2005) e principalmente de monofilia têm vindo a ser contestadas (Funk & Omland, 2003; Wahlberg *et al.*, 2003; Zakharov *et al.*, 2009).

Um dos genes mais utilizados para o efeito é o Citocromo-Oxidase I (COI). Este gene codifica para uma subunidade do complexo do COI, responsável pelo transporte de electrões da cadeia respiratória (Palumbi 1996). Ainda que tenha uma sequência de aminoácidos bem conservada, este gene apresenta uma considerável variabilidade, especialmente na região 5', i. e. dos primeiros 650 pares de bases, tendo, por isso, vindo a ser usado com um sucesso apreciável em vários estudos filogenéticos em espécies estreitamente aparentadas de Lepidoptera, incluindo borboletas diurnas (*p. e.* Beltrán *et al.*, 2002; Brower, 1994; Caterino & Sperling, 1999; Monteiro & Pierce, 2001; Rand *et al.*, 2000; Wahlberg *et al.*, 2003). Actualmente, é o gene considerado ideal para o projecto *barcoding* em animais, *i.e.*, para a identificação imediata de espécies através da análise desse pequeno fragmento genómico de 650 pares de bases (Herbert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2005) apesar de todas as lacunas que também se lhe atribuem e já mencionadas anteriormente (para uma revisão completa consultar Funk & Omland, 2003).

### 2.3.2. Reacção de PCR e sequenciação

A amplificação do ADN extraído foi levada a cabo recorrendo à reacção de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizada para amplificar fragmentos de ADN com recurso a *primers* específicos que flaqueiam a região de interesse (Palumbi 1996). A receita de PCR, para um volume total de 25µl e o regime térmico encontram-se em anexo (Anexo XX).

Para a amplificação do gene COI foram usados primers universais, largamente utilizados no projecto *barcoding*: LepF: 5' ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG 3' e LepR: 5' TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3' (Hajibabaei *et al.*, 2005).

Este par de primers revelou-se eficaz na obtenção de um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases na secção 5' do gene COI.

Os produtos de amplificação foram verificados para a presença de ADN em gel de Agarose e purificados segundo o protocolo SureClean (Bioline®).

Estes fragmentos foram em seguida sequenciados na Faculdade de Ciências de Lisboa recorrendo-se ao sequenciador automático ABI310 (Applied Biosystems®) segundo os protocolos do fabricante.

### 2.3.3. Análise filogenética

Os cromatogramas obtidos na Sequenciação automática foram analisados, corrigidos e emparelhados (*forward* e *reverse*) através do programa Sequencher® 4.05 (GeneCodes®). O seu alinhamento com outras seqüências obtidas do GenBank efectuou-se recorrendo ao programa CLUSTALX® (Thompson *et al.*, 1997). O alinhamento resultante foi editado com o software BIOEDIT®, sendo que os ficheiros *fasta*, com as seqüências alinhadas foram convertidos em formato *nexus* com recurso ao programa Concatenator® (Pina-Martin & Paulo, 2008).

Com o programa Modeltest 3.07® foi escolhido o modelo de evolução que melhor explica a divergência genética verificada (Posada & Crandall, 1998). As filogenias são usualmente apresentadas sob a forma de gráficos arborescentes e a escolha do método de análise e construção das mesmas é objecto de intenso debate entre os proponentes de cada um dos métodos. Apesar de cada um diferir na sua eficiência na reconstrução da árvore “real”, o seu sucesso depende dum vasto rol de variáveis, pelo que se torna difícil afirmar teoricamente qual é o melhor método. Não poucas vezes têm de ser escolhidos vários métodos incidindo uma boa parte da análise sobre a sua comparação; as principais diferenças incidem sobretudo nos nodos que estão mal resolvidos, *i. e.*, que têm baixo suporte estatístico (Page & Holmes, 1998; Nei & Kumar, 2000).

**Máxima Parcimónia:** Trata-se de um método não paramétrico de estimação de filogenias. A árvore mais parcimoniosa é seleccionada entre todas as hipóteses como a que requer o menor número de passos para a obtenção da variabilidade observada. Este método utiliza toda a informação disponível mas não tem bons resultados se os

caracteres são convergentes ou existe uma grande diferenciação entre alguns dos elementos (“*long-branch attraction*”) (Felsenstein, 1978; Siddal & Whitting, 1999).

**Máxima Verosimilhança:** Esta abordagem necessita que *a priori* seja estabelecido um modelo evolutivo a que os dados obedecem e que possa exprimir a sua variação e alteração. Considera a existência de uma determinada probabilidade associada à ocorrência das diversas associações entre os elementos da análise. O problema associado a este método é que é computacionalmente exigente, tornando-se pouco prático na análise de conjuntos de dados muito grandes (Felsenstein, 1981).

**Análise Bayesiana:** Esta abordagem apenas recentemente tem vindo a ser aplicada à análise de filogenias mas tem-se provado eficiente e com resultados satisfatórios. A análise dos dados e obtenção das árvores assemelha-se à máxima verosimilhança mas revela-se muito mais rápida e permite uma maior gama de acções sobre os mesmos. (Yang & Rannala, 1997; Rannala & Yang, 2003)

Os dados analisados segundo os métodos de máxima parcimónia e máxima verosimilhança foram obtidos através do programa PAUP® 4.0b10 (Swofford *et al.* 1996) e sujeitos a análises de *bootstrap* para 1000 replicados. Para a análise de Máxima Verosimilhança foi utilizado o programa Modeltest® 3.07 (Posada & Crandall, 1998) a fim de se obter o modelo evolutivo que melhor se adaptasse aos dados. Para a análise Bayesiana recorreu-se ao programa Mr Bayes® 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) tendo sido usado o método de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), calculado para 2000000 gerações amostradas a cada 100.

#### 2.3.4. Genética populacional

Através do programa Network 4.5® (Bandelt *et al.*, 1999) pretendeu-se agrupar a diversidade verificada nas sequências de *Euchloe tagis* segundo haplotipos que foram pictograficamente representados numa rede. Este método torna possível revelar a estruturação populacional de uma determinada espécie através da reconstrução da principal sequência de eventos que deram origem ao padrão genético verificado actualmente (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998; Avise 2000; Paulo *et al.*, 2002) e evita as politomias reveladas nas análises de parcimónia feitas utilizando sequências

de ADNmt e que terão origem em mutações reversas (back mutations) e homoplasias (Bandelt *et al.*, 1995).

Paralelamente, investigou-se sobre a diversidade genética (haplotípica e nucleotídica) com recurso à análise de variação molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) visando principalmente o conhecimento dos padrões geográficos de subdivisão populacional. A AMOVA baseia-se em estatísticas  $\phi$ , análogas às estatísticas F (Holsinger & Weir, 2009) mas aplicadas a dados como sequências (Excoffier *et al.*, 1992). Entre os parâmetros analisados existem três de especial relevância:  $\phi_{ST}$  variação genética de cada população contra a verificada globalmente;  $\phi_{SC}$  variação de uma população contra as restantes próximas geograficamente e  $\phi_{CT}$ , a variação entre diferentes grupos. Com os dados de sequenciação o número de mutações que diferenciam os diferentes haplotipos é tido em conta para os cálculos da AMOVA. As diferentes populações foram inicialmente agrupadas quer com base na geografia e distância física, quer com base nos *clades* identificados na análise filogenética ou com base na taxonomia tradicional tendo sido testadas as várias combinações. A combinação que maximizasse  $\phi_{CT}$  sendo estatisticamente significativa seria mais provavelmente a subdivisão geográfica real. Todas estas estatísticas foram levadas a cabo recorrendo ao programa Arlequin v3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Na análise filogenética optou-se pela inclusão e representação apenas dos diferentes haplotipos e não de todos os indivíduos em virtude da maior facilidade de visualização dos dados nas árvores filogenéticas e optimização do tempo de análise computacional. Contudo, estes foram utilizados tanto na elaboração da rede de haplotipos como na AMOVA, através das frequências com que foram amostrados nas diferentes populações.

## RESULTADOS

### 3.1 Distribuição da *Euchloe tagis* em Portugal

O conhecimento de que esta espécie de borboleta tem requisitos ecológicos específicos e dependentes de alguns factores facilmente identificáveis como a existência a nível local de qualquer das plantas alimentícias ou um substrato com elevadas concentrações de Magnésio ou Cálcio permitiu não só planear o esforço de campo como realizar um estudo preliminar de predição da distribuição da *Euchloe tagis* em Portugal.

#### 3.1.1 As plantas do género Iberis

A consulta das principais referências da flora de Portugal permite averiguar que, contra a grande diversidade de espécies no género *Iberis* que existe em Espanha, em Portugal aparecem apenas cinco *taxa*, pertencentes a três espécies distintas de Assembleias: *Iberis procumbens procumbens*, *I. procumbens microcarpa*, *Iberis ciliata contracta*, *I. ciliata welwitschii* e *Iberis pectinata* (Pereira Coutinho, 1913; Franco, 1971; Da Silva & Franco, 1993; Moreno, 1997) (Anexo V) cuja distribuição em Portugal não está generalizada, apresentando-se em bolsas mais ou menos isoladas, raramente ocorrendo simpatricamente.

*Iberis procumbens procumbens*. Ocorre fundamentalmente em zonas arenosas litorais onde é uma espécie característica das dunas cinzentas atlânticas, entre a Galiza e o cabo de São Vicente (Da Silva, 1991; Moreno, 1997). Biogeograficamente está ligado aos sectores litorais das províncias Gaditano-onubo-Algarviense e Cantabro-Atlântica. Tanto a pesquisa bibliográfica como as prospecções de campo permitiram obter um mapa de distribuição em quadrículas de 10km de lado (Anexo VI, Fig. 26a)

*Iberis procumbens microcarpa*. Taxon endémico das elevações calcárias sublitorais da zona central e sul de Portugal e incluído no Anexo II da Directiva Habitats. Encontra-se de uma forma geral limitado à Serra da Boa Viagem, Maciço Calcário Estremenho, ao sector Arrabidense e zonas envolventes (Braun Blanquet *et al.*, 1964; Franco, 1971; Espírito Santo, 1981; Moreno, 1997), portanto totalmente incluído na Província gaditano-Onubo-Algarviense. Curiosamente, não aparece nas serras calcárias de Sicó e Alvaiázere (Lopes, 2001). Tanto a pesquisa bibliográfica como as prospecções

de campo permitiram obter o mapa de distribuição em quadrículas de 10km de lado (Anexo VI, Fig. 26b).

*Iberis ciliata contracta* → De ampla distribuição no interior calcário da Península Ibérica e Rif (Marrocos). Em Portugal apresenta bolsas isoladas de populações no Barrocal Algarvio, Serra da Adiça / Ficalho, Anticlinal de Estremoz e interior de Trás-os-Montes e Beira Alta, desde o Douro até ao Parque Natural de Montesinho (Franco, 1971; Pinto Gomes, 1995; Moreno, 1997; Almeida, 2001; Aguiar, 2002; Pinto Gomes & Ferreira, 2005). Aparece portanto nas Províncias Carpetano-Iberico-Leonesa e Luso-Extremadurenses. Prefere solos pedregosos e consolidados com alto teor em calcário e / ou magnésio. Tanto a pesquisa bibliográfica como as prospecções de campo permitiram obter o mapa de distribuição em quadrículas de 10km de lado (Anexo VI, Fig. 26c).

*Iberis ciliata welwitschii* → Taxon limitado ao sudoeste da Península Ibérica, em Portugal aparece em zonas arenosas e ácidas desde o Algarve ao Ribatejo, sendo característico de pinhais litorais a baixa altitude. Trata-se de um taxon mundialmente limitado à Província Gaditano-Onubo-Algarviense e é mais abundante no sector Ribatagano-Sadense. Tanto a pesquisa bibliográfica como as prospecções de campo permitiram obter o mapa de distribuição em quadrículas de 10km de lado da Figura 26d (Anexo VI).

*Iberis pectinata* → Ao contrário das outras espécies, é uma planta anual colonizadora de ambientes perturbados (sub-nitrófila) que no entanto em Portugal se encontra muito localizada nas imediações de Vila Nova de Milfontes (litoral BAL) (Franco, 1971; Moreno, 1997). A pesquisa bibliográfica permitiu obter o mapa de distribuição constante na Figura 26d (Anexo VI).

De especial relevância, dado que teoricamente a Branca-Portuguesa se alimenta sobre todas as espécies disponíveis de Assembleias, será a distribuição de todos os *taxa* portugueses do género *Iberis*, que se apresenta na Figura 12.

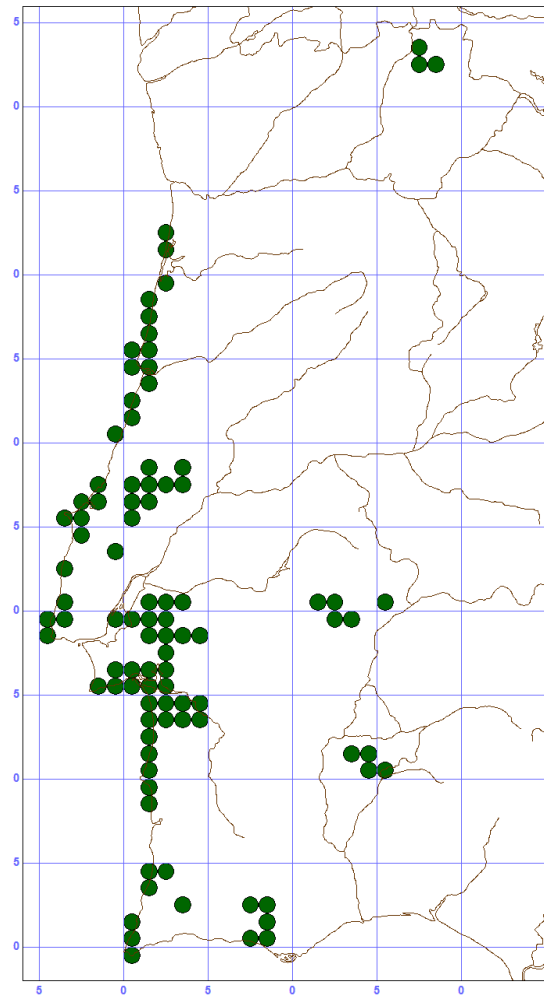


Figura 12: Distribuição conjunta dos 5 taxa do género *Iberis* em Portugal de acordo com a bibliografia consultada (ver texto) e o trabalho de campo desenvolvido e segundo quadrículas de 10km de lado.

### 3.1.2 Os solos calcários em Portugal

Tendo como base a informação publicada e disponível de forma imediata no Atlas Digital do Ambiente (disponível em: [www.2.apambiente.pt/atlas/est/index.jsp](http://www.2.apambiente.pt/atlas/est/index.jsp)) assim como referências que abordam essencialmente os calcários e dolomitos consolidados em Portugal (calcários e dolomitos Jurássicos e calcários Paleozóicos metamorfizados) (Manuppella & Balacó Moreira, 1975; Manuppella *et al.*, 1981), foi possível obter um mapa simplificado da distribuição das rochas carbonatadas com elevado conteúdo em Cálcio e Magnésio, na Figura 13. Na elaboração deste mapa o critério de consideração de quadrículas UTM de 10km de lado como contendo rochas carbonatadas foi o de que a área ocupada por este tipo de rochas deveria ser igual ou superior a  $25\text{km}^2$ ,  $\frac{1}{4}$  da área total da quadrícula.



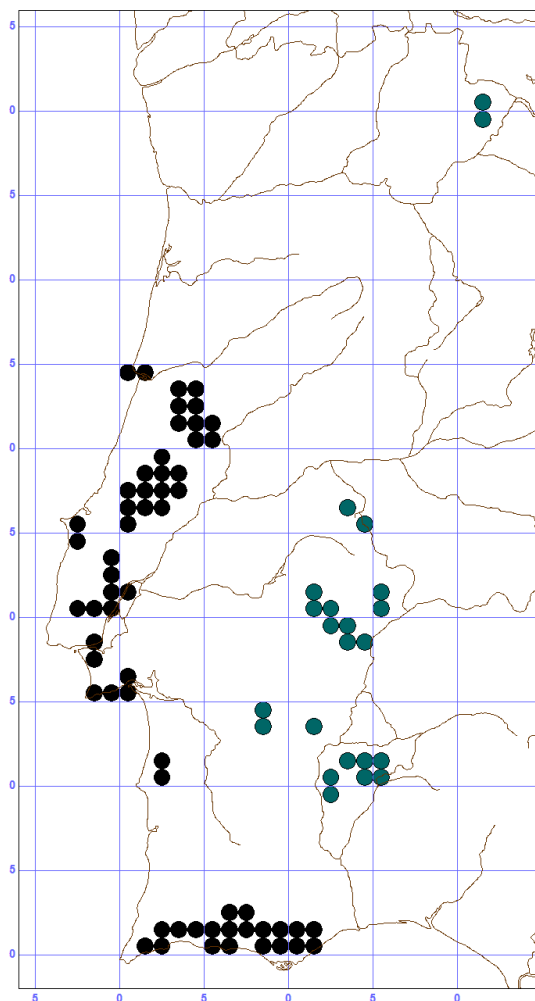


Figura 13: Distribuição dos Calcários e Calcários dolomíticos em Portugal segundo quadrículas de 10km de lado. A preto, calcários sedimentares Jurássicos. A azul, calcários cristalinos Ordovícicos e Devónicos.

As manchas de rochas carbonatadas mais importantes em Portugal não chegam a 10% do território nacional (Almeida *et al.*, 1979) e são essencialmente de dois tipos: Calcários Jurássicos sedimentares localizados nas orlas ocidental e meridional (Barrocal Algarvio, Maciço Calcário Estremenho, Serra da Arrábida e outros pequenos afloramentos) e Calcários e dolomitos metamórficos de origem Paleozóica, dispersos em pequenas manchas no interior (Serra da Adiça, Anticlinal de Estremoz, interior de Trás os Montes, etc.). Se por um lado os primeiros estão dispostos em grandes manchas, é notável a exiguidade dos calcários e dolomitos metamórficos que se encontram em manchas isoladas no interior do país. Contudo, estas manchas não se encontram distantes de outras em território espanhol o que permite supor que não estarão totalmente isoladas no que se refere ao intercâmbio de animais e plantas, apesar de

efectivamente se comportarem como ilhas de habitat, sujeitas aos constrangimentos e fenómenos existentes nestas circunstâncias (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

### 3.1.3 Inferência das áreas de distribuição de *Euchloe tagis*

Ao se sobrepor os mapas de distribuição das variáveis presença de calcários ou plantas do género *Iberis* obteve-se um mapa de distribuição potencial de *Euchloe tagis* em Portugal e que serviu de base para o trabalho de campo. (Fig. 14) Este incidiu logicamente nas áreas em que coincidia não só a existência de formações carbonatadas como a existência de plantas alimentícias (Serra da Adiça, Anticlinal de Estremoz, Maciço Calcário Estremenho, Barrocal Algarvio), aos quais foi dada prioridade, mas também foram considerados outros em que apenas uma das variáveis estava cartografada (Viana do Alentejo, Santiago do Cacém, Serra de Portel, Minas de Santo Adrião).

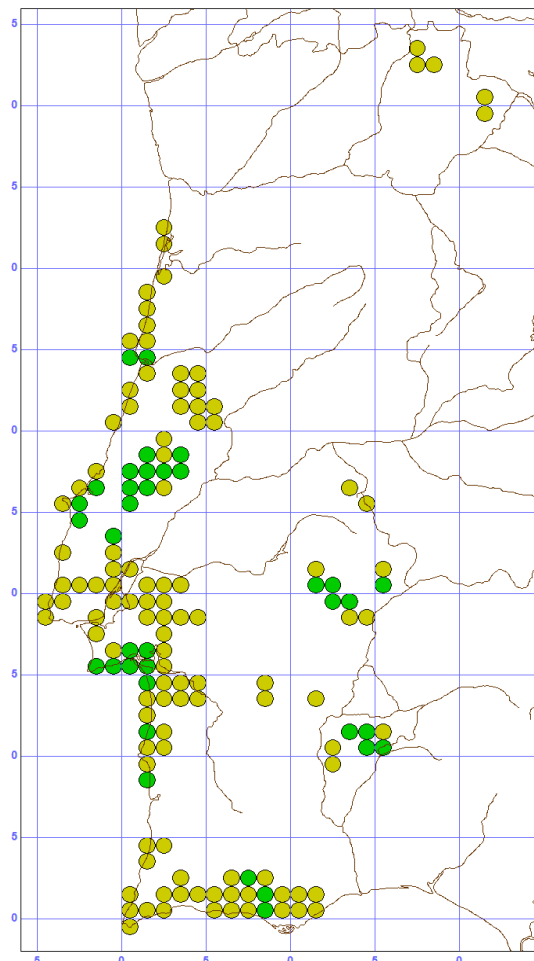


Figura 14: Distribuição conjunta das variáveis estudadas na predição da distribuição da Branca-Portuguesa, *E. tagis* em Portugal. A verde: quadrículas de 10km em que se verifica a existência de calcários e de uma das espécies de *Iberis*. A amarelo: apenas se verifica a presença de um dos factores.

Terminado o período de prospecção de campo, que abrangeu os meses de Fevereiro a Junho de 2007-2009 pôde-se comprovar a existência de outras populações de *Euchloe tagis* em Portugal para além das anteriormente conhecidas p. e. em Garcia Barros *et al.* (2003), conforme ilustrado na Figura 15. Aqui assinalam-se os locais de ocorrência comprovada da Branca-Portuguesa assim como as referências bibliográficas que não puderam ser corroboradas durante o estudo.

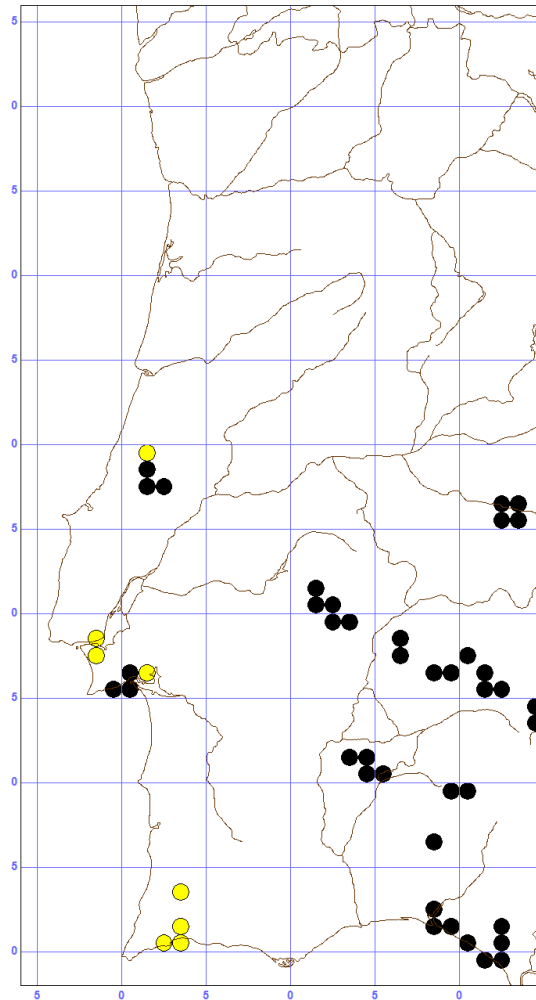


Figura 15: Distribuição conhecida de *E. tagis* em Portugal e áreas limítrofes de Espanha. A preto, quadrículas de onde se conhecem actualmente populações de *E. tagis*. A amarelo, referências históricas a esta espécie que não puderam ser comprovadas durante este projecto.

#### 3.1.4 Locais de ocorrência e sua caracterização

Segue-se uma breve caracterização dos locais onde foi detectada a presença de *E. tagis* em Portugal durante o período em que decorreu este trabalho assim como a

indicação das quadrículas onde a detecção foi positiva e as datas das observações, cronologicamente:

**Serra da Arrábida e Serra de São Luís (Península de Setúbal):**

Quadrículas UTM 10km: 29SMC95; 29SNC05; 29SNC06

Observações: 17-III-2007; 10-II-2008; 15-III-2008; 25-II-2009; 19-III-2009; 19-IV-2009.

A Serra da Arrábida, no sul da península de Setúbal a apenas 50km de Lisboa encerra uma biodiversidade notável. Corresponde a uma cadeia de afloramentos de calcários e dolomitos do Jurássico rodeada por uma matriz de calcários miocénicos mais recentes e que apenas sobrepassa os 500m de altitude (Formosinho 501m). De relevo extremamente acidentado, na Serra da Arrábida são de realce os afloramentos rochosos proeminentes e o matagal mediterrânico denso que cobre os seus solos esqueléticos. A heterogeneidade de condições criadas pelas zonas mais expostas ou os vales mais abrigados proporciona a existência de um mosaico entre a floresta pré-climática arborescente, com grande preponderância de elementos lianóides da durissilva pliocénica, e o matagal mediterrânico dominado pelo carrasco (*Quercus coccifera*) e outras espécies que suportam condições edafo-xerófilas e são resilientes ao fogo.

Fitogeograficamente a Serra da Arrábida apresentar-se-ia originalmente em equilíbrio entre duas alianças caracteristicamente mediterrânicas. Nas encostas viradas a norte e oeste e menos adaptada à secura em que o *Quercus faginea* seria predominante, a *Arisaro-Quercetum fagineae* que hoje apenas resiste nos vales mais encaixados (Mata do Solitário, Mata Coberta, etc.). Por outro lado, nas encostas orientadas a sul e sudoeste é predominante a associação do zambujeiro (*Olea europaea var. sylvestris*) e da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*), entre outras, a *Oleo-Ceratonion*. Actualmente a Arrábida (e a Serra de São Luís, que geomorfológica e fitossociologicamente é muito semelhante acima dos 300m) é quase inteiramente coberta pelas etapas seriais de degradação, destacando-se aquela onde predomina o carrasco, *Melico-Quercetum cocciferae* (Braun-Blanquet *et al.*, 1958; Catarino *et al.*, 1982; Correia, 1988). Grandes áreas encontram-se em etapas ainda mais degradadas e ricas em flores anuais devido à acção recorrente do fogo. Nas Serras da Arrábida e São Luís a única espécie de Assembleia presente é *Iberis procumbens* ssp. *microcarpa*, abundante nas bermas das estradas, entre as rochas e zonas abertas.

A Serra da Arrábida é o local tradicional de ocorrência da *E. tagis* em Portugal e é aí conhecida pelo menos desde o início do século XX, assim como na Serra de São Luís. Contudo, desta última não era conhecida desde os anos 70 do século XX (Maravalhas, *com. pes.*, 2007; Santos-Carvalho, *com. pes.* 2008), pelo que era relevante a confirmação da sua presença, como se veio a verificar.

### **Serra da Adiça – Ficalho (Baixo Alentejo)**

Quadrículas UTM 10km: 29SPC31; 29SPC40; 29SPC50; 29SPC41

Observações: 28-III-2007; 22-IV-2007; 28-II-2008; 29-III-2008; 2-IV-2008; 23-IV-2008; 8-III-2009.

A Serra da Adiça é uma sucessão de três agrupamentos de montanhas e colinas relativamente baixas com uma orientação NNO-SSE no BAL perto da fronteira com Espanha e que confluem perto da cidade de Moura. Esta Serra é formada por diversos relevos alinhados sendo os mais altos Ficalho (523m), Adiça (477m) e Álamo (425m) que contrastam com a aplanada peneplanície alentejana circundante. A área é porém heterogénea do ponto de vista geológico e geomorfológico pela presença de um mosaico de diversos tipos de rochas carbonatadas e algumas intrusões de rochas siliciosas circundando um núcleo dolomítico. As rochas carbonatadas cristalinas agrupam-se aqui em duas categorias distintas: dolomitos do Câmbrio (“Formação Dolomítica”) que abarca a maior parte dos terrenos elevados e o mosaico constituído pelos mármore e calcários dolomíticos do Ordovício médio.

A zona é dominada por campos agrícolas de extensão considerável, na sua maioria olivais usualmente abandonados em direcção aos cumes das maiores elevações, onde a flora se revela particularmente interessante. É de destacar a presença de diversas espécies calcícolas e a grande diversidade, com mais de 500 *taxa* conhecidos (Pinto Gomes, 1995; Rodrigues *com. pes.*, 2009). A Serra inclui várias formações vegetais relevantes mas destaca-se uma cobertura densa de matos dominada por *Quercus coccifera*, *Lonicera implexa* e *Cistus albidus*, compreendendo os estados seriais de degradação de uma floresta mediterrânica de fâcies seco do *Quercetea ilicis* com carácter calcícola. As associações vegetais predominantes nos locais onde foi detectada a *E. tagis* são os carrascais de *Myrto-Quercetum cocciferae* e os mais degradados estevais calcícolas de *Phlomido-Cistetum albidus* e giestais de *Genisto hirsutae-Cistetum*

*ladaniferae*. Estas formações estão em mosaico com afloramentos de dolomitos e calcários dolomíticos e clareiras onde cresce a planta alimentícia, *Iberis ciliata contracta*.

### **Anticlinal de Estremoz (Alto Alentejo)**

Quadrículas UTM 10km: 29SPC39; 29SPC29; 29SPD10; 29SPD20; 29SPD11

Observações: 12-IV-2007; 23-IV-2007; 27-IV-2008; 17-V-2008; 22-III-2009.

O Anticlinal de Estremoz é uma formação geológica complexa com orientação NW-SE que abarca um conjunto de colinas com uma altitude média de 400m, localizadas sensivelmente entre Sousel e o Alandroal, na região leste do Alto Alentejo. Geologicamente muito semelhante à Serra da Adiça / Ficalho já que a origem das suas rochas é análoga, as rochas carbonatadas intensamente metamorfizadas (mármore do complexo Vulcano-Sedimentar de Estremoz, do Ordovícico) aparecem aqui em muito maior abundância rodeando a Formação Dolimítica do Câmbrio Inferior. São abundantes os dolomitos ricos em óxidos de cálcio e magnésio com proporções destes elementos de 20 e 35%, respectivamente (Silva & Camarinha, 1960; Gonçalves & Coelho, 1974; Oliveira *et al.*, 1991). Assim, ao contrário do que se sucede na Serra da Adiça e dado que os mármore são considerados de boa qualidade, a área está repleta de minas a céu-aberto, deixando poucos locais onde a vegetação natural adquire um porte pré-climático.

Contudo, em alguns pontos desenvolve-se uma garrigue densa dominada por *Quercus coccifera*, associada a uma interessante flora calcícola e onde se destacam diversas espécies de orquídeas, *Pistacia terebinthus*, *P. lentiscus*, *Cistus albidus* e *C. monspeliensis*, correspondendo à aliança *Asparago albi-Rhamnion oleoidis*. As etapas seriais mais comuns são o *Phlomido-Cistetum albidu* nas orlas do carrascal e, em situações de maior intervenção ou sucessão ecológica mais atrasada (aquando da colonização de olivais abandonados cujos horizontes superiores foram lixiviados), *Cistus ladanifer* torna-se abundante. *Iberis ciliata contracta* aparece aqui em olivais mais ou menos abandonados, orlas do carrascal e clareiras.

### **Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros (Maciço Calcário Estremenho)**

Quadrículas UTM 10km: 29SND17; 29SND18; 29SND27.

Observações: 19-IV-2007; 18-V-2007; 21-V-2007; 14-V-2008; 1-VI-2008; 28-III-2009

O Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros encontra-se na mais extensa e importante mancha calcária em Portugal, o Maciço Calcário Estremenho, que ocupa uma extensa área no oeste do país. Geologicamente estas montanhas são constituídas fundamentalmente por calcários sedimentares do Jurássico muito duros que circundam dois grandes núcleos de dolomite, correspondendo às serras dos Candeeiros (631m) e d' Aire (678m). Embora ocorra uma relativamente elevada pluviosidade anual (P=1000 mm/a), a elevada permeabilidade dos solos e da rocha produzem condições de secura superiores às esperadas, estando geralmente ausentes cursos de água de grande dimensão.

A vegetação é muito variável, já que depende do efeito dos ventos marítimos, da secura e da disponibilidade hídrica, mas predominam as espécies xerófilas e heliófilas aromáticas. Nas zonas de rocha mais impermeável ou de solos mais profundos onde o efeito do fogo é menos frequente desenvolve-se uma luxuriante floresta mesófila de *Arisaro-Quercetum broteroi* onde *Quercus faginea* ssp. *broteroi* é a espécie dominante. Todavia, a maior parte da área encontra-se ou ocupada pelas etapas seriais do *Lonicero implexae-Quercetum rotundifoliae*, os prados de *Teucrio capitati-Thymetum sylvestris helianthemetosum violaceae* ou outras comunidades de estádios muito primários da sucessão ecológica, em mosaico com manchas de garrigue / maquis de carrasco, aqui uma variante endémica, o *Quercetum coccifero-airensis* (Espírito-Santo & Lousã, 1981). A única espécie de *Iberis* presente é a vulnerável *Iberis procumbens* ssp. *microcarpa* que cresce em fendas das rochas, caminhos florestais e clareiras por todo o Parque. *E. tagis* foi encontrada em zonas onde o matagal se encontrava mais bem conservado, perto de Porto de Mós e de Minde e revelou-se ausente nas zonas onde a vegetação não ultrapassava sensivelmente os 50cm de altura.

### 3.1.5 Habitats Naturais Prioritários, NATURA 2000.

A Branca-Portuguesa, no conjunto dos locais onde foi localizada está associada a diversos habitats prioritários para a conservação segundo a rede europeia NATURA 2000 (ICN, 2006) que importa enumerar tendo em vista a sua conservação:

Habitat **5330pt5** – (Matos termomediterrânicos pré-desérticos), Carrascais, espargueirais e matagais afins basófilos:

Habitat **5330pt7** – Matos baixos calcícolas

Habitat **6110** – Prados rupícolas calcários ou basófilos da *Alysso-Sedion-albi*.

Habitat **6220pt1** – (Subestepes de gramíneas e anuais da Thero-Brachipodietea) Arrelvados anuais neutrobasófilos;

Habitat **6210** – Prados secos seminaturais e fâcies arbustivas em substrato calcário (*Festuco-Brometalia*) (importantes habitats de orquídeas)

Habitat **8210** – Vertentes rochosas calcárias com vegetação casmofítica.

Habitat **8240** – Lages calcárias.

Habitat **9340pt2** – Florestas de *Quercus rotundifolia* sobre calcários

### 3.1.6 Locais de detecção negativa:

**Margem sul do Rio Tejo perto de Almada (Alfeite, Cacilhas, Almada):** Referidas várias vezes na bibliografia, e onde provavelmente se encontra a localidade-tipo da Branca-Portuguesa, esta área foi prospectada sem sucesso já que actualmente não existe habitat disponível em virtude da urbanização, que teve lugar de forma mais intensiva na segunda metade do século XX. Já não se encontram aqui os tradicionais vinhedos onde a espécie foi descoberta originalmente nem as colinas calcárias albergam a vegetação original pelo que como em Maravalhas *et al.*, (2003), se considera esta população como extinta.

**Afloramentos calcários de Viana do Alentejo – Alvito (BAL):** A área foi prospectada na Primavera de 2008 com resultados negativos: não foi detectada qualquer espécie do género *Iberis* ou a Branca-Portuguesa. Apesar de se verificar a presença de calcários e mármore, os habitats encontravam-se em mau estado de conservação, estando sujeitos a pastoreio intensivo e / ou eram ocupados por pedreiras de mármore.

**Calcários da Fatiota, Santiago do Cacém (BAL):** A área foi prospectada na Primavera de 2008, dado que existe aí uma mancha significativa de calcários Jurássicos mas o resultado foi negativo tanto para as plantas alimentícias como para a Branca-Portuguesa.



**Barrocal Algarvio PTCO0049 (ALG):** Diversas zonas do Barrocal algarvio entre o Cabo de São Vicente e Tavira foram prospectadas nas Primaveras de 2008 e 2009 com resultados negativos para *E. tagis*. Contudo, foi detectada a presença de *Iberis ciliata contracta* na zona da Rocha da Pena, pelo que não se deverá pôr de parte a ocorrência da borboleta nesta e noutras áreas das imediações. As áreas visitadas foram os arredores da aldeia da Luz, Rocha da Pena, Moncarapacho, Loulé, Estói e São Brás de Alportel. Previamente citada para o extremo oeste do Barrocal (Alvor e Lagos) por Corley *et al.* (2000), estes registos permanecem não confirmados.

**Minas de Santo Adrião, PTCO0042 (TM):** Visitada na Primavera de 2009, nesta área não se detectou a presença nem de *Iberis ciliata contracta* nem de *E. tagis*, apesar de o habitat estar de uma forma geral bem conservado. A exiguidade deste é no entanto de assinalar.

**Arredores de Serpa (BAL):** Perto da cidade de Serpa existem afloramentos de calcários cristalinos que no entanto se encontram quase na totalidade desprovidos de vegetação natural, sendo que esta foi substituída por olivais. Na Primavera de 2009 não foi detectada a presença nem de *E. tagis* nem *Iberis ciliata contracta*.

**Serra de Montejunto, PTCO0048 (Maciço Calcário Estremenho):** Esta Serra apresenta não só o substrato adequado como a vegetação se encontra bem desenvolvida e é análoga à verificada em zonas como a Serra da Arrábida ou a Serra dos Candeeiros, mas não foi aqui detectada a presença de *E. tagis* ou *Iberis procumbens microcarpa*, apesar de ter sido visitada nos três anos do trabalho de campo.

### 3.2 Biologia, Comportamento e Desenvolvimento

As prospeções de campo assim como as informações adquiridas durante o desenvolvimento dos estádios pré-imaginais permitiram obter uma ampla gama de conhecimentos sobre o ciclo de vida da *E. tagis* em Portugal:

#### 3.2.1 Fenologia e *Sex-ratio*

Todas as referências disponíveis sobre a Branca-Portuguesa apresentam-na como uma espécie univoltina em que os adultos voam na Primavera. Contudo, o período de voo varia de ano para ano já que parece estar fundamentalmente dependente das condições climáticas e tal deverá ser especialmente relevante nesta espécie dado que tudo indica que a diapausa pode durar mais de um ano.

De acordo com as prospeções de campo durante este trabalho e os dados obtidos da bibliografia e exemplares em colecção (JPC, FSC, DC), a *E. tagis* apresenta-se como univoltina em Portugal, com um período de voo que abarca os meses de Fevereiro a princípios de Junho, como se encontra exemplificado na Figura 16.

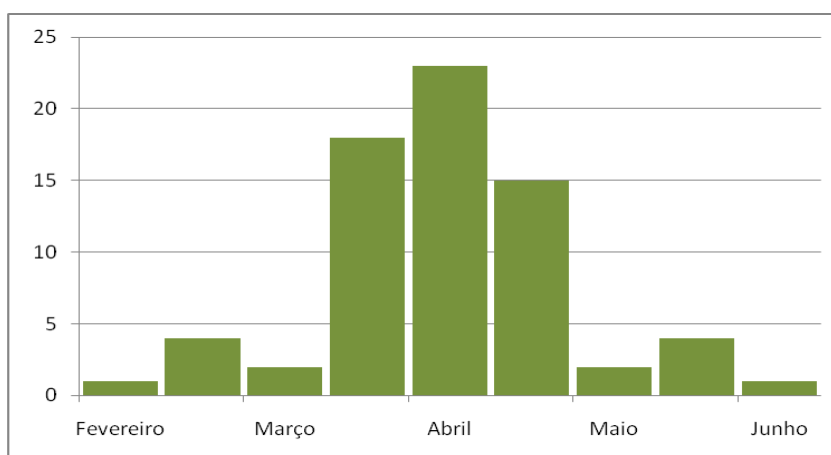


Figura 16: Período de voo da Branca-Portuguesa em Portugal de acordo com todos os dados disponíveis: dados bibliográficos, dados de campo recolhidos durante este trabalho e colecções consultadas. O eixo das ordenadas corresponde ao número de registos disponíveis e o das abcissas representa cada quinzena do mês em causa.

Deverá no entanto ser feita ressalva de que os registos disponíveis muitas vezes dependem quer de factores climáticos num determinado ano, quer da disponibilidade dos observadores e ainda do detalhe com que estes são feitos. Acerca deste último ponto, é de notar que muitos dos registos antigos apenas estão apresentados sob a forma

do mês de observação pelo que carecem de resolução. Assim, aos registos que apenas continham os meses de observação foram atribuídas datas para a 2ª quinzena (Março) ou para a 1ª quinzena (Abril e Junho) conforme o mês ao qual estavam associados.

O registo obtido mais cedo no ano corresponde a um macho capturado em 10 de Fevereiro de 2009 na Serra da Arrábida e os mais tardios são de uma fêmea observada na zona de Minde (Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros) em 1 de Junho de 2008 e de uma fêmea etiquetada como proveniente de “Leiria”, capturada em Junho de 1943 por Maria Amélia Silva Cruz e constante nas colecções da Universidade do Porto. Contudo, a grande maioria dos registos correspondem ao período entre a segunda quinzena de Março e a segunda quinzena de Abril.

As prospecções de campo foram efectuadas apenas nas horas de maior conspicuidade para a maioria das borboletas diurnas de climas temperados, entre as 10h e as 15h (Pollard & Yates, 1993). Foram observados 181 exemplares de *E. tagis* repartidos pelas 5 populações portuguesas da espécie, sendo que 147 foram machos e 34 foram fêmeas. O *sex-ratio* observado no campo é de 4,32:1.

### 3.2.2 Comportamento

O comportamento dos imagos à altura da observação foi registado e codificado:

- 1) Voo rápido acima de 2m de altura do solo. Caracterizado por um voo directo acima das estruturas como a vegetação e as rochas, com poucos movimentos laterais.
- 2) Voo lento entre os arbustos a menos de 1,5m de altura. Caracterizado por batimentos fracos das asas, voo entre a vegetação baixa do carrascal, contorno da mesma e inspecção directa do meio.
- 3) Alimentação. De néctar de flores disponíveis no habitat. As espécies da família Pieridae alimentam-se poisando com as asas fechadas ou entre-abertas sobre as flores.
- 4) Termorregulação. De asas abertas, poisadas sobre uma estrutura, que pode incluir um arbusto ou uma rocha por mais de cinco segundos.

A distribuição destes comportamentos pelas 181 borboletas observadas é apresentada no gráfico circular na figura 17.

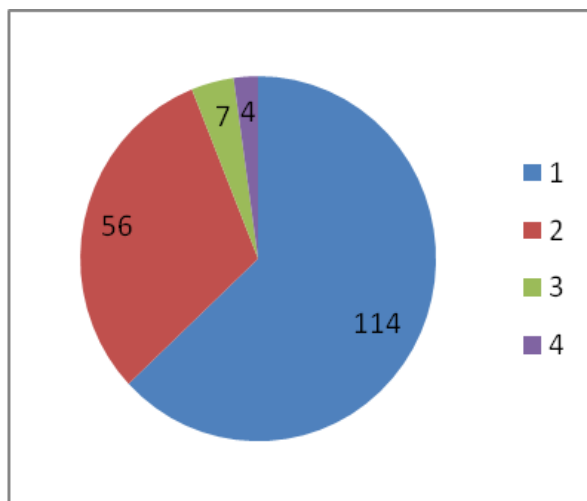


Figura 17: Comportamento dos indivíduos de *E. tagis* (N=181) de acordo com as observações: 1) Voo rápido acima de 2m; 2) Voo baixo entre os arbustos; 3) Alimentação; 4) Termorregulação.

O comportamento predominante na Branca-Portuguesa durante as horas de maior actividade é o voo rápido ao longo das linhas de cumeada ou a subir e a descer as colinas. Dos 181 exemplares observados, 114 apresentavam-se com este comportamento, perto de 63%, enquanto pouco menos de metade (n=56, 30,9%) se encontravam em voo de prospecção entre a vegetação baixa. Uma percentagem muito baixa foi observada a alimentar-se (n=7, 3,9%) ou em termorregulação (n=4, 2,2%).

Numa análise tendo em conta o sexo de cada indivíduo, os resultados são significativamente diferentes entre machos e fêmeas, como ilustrado na figura 18.

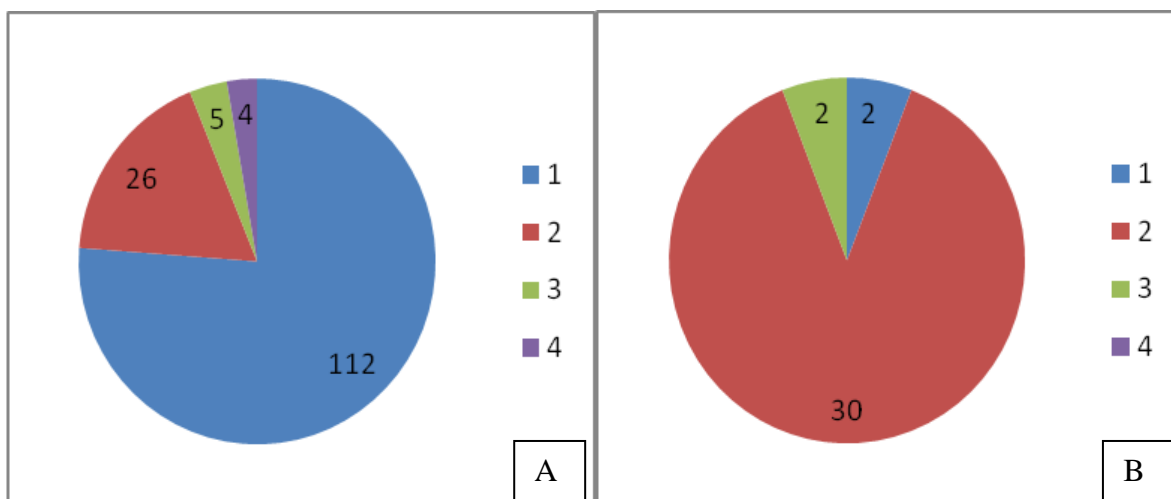


Figura 18: Comportamento dos indivíduos de *E. tagis*: A) Machos (n=147). B) Fêmeas (n=34). 1) Voo rápido acima de 2m; 2) voo baixo entre os arbustos; 3) Alimentação; 4) Termorregulação.

Ao passo que os machos demonstram sobretudo um comportamento móvel em que a maior parte percorre activamente o habitat disponível e se concentra nos topos dos montes, praticando o *hilltopping* e inserindo-se claramente na categoria de “patrulhadores” (*sensu* Scott, 1968), as fêmeas apresentam maioritariamente um comportamento prospectivo do meio, o seu voo é muito menos vigoroso e activo. Tanto a alimentação como a termorregulação foram observadas em poucas ocasiões.

### **Fontes de néctar:**

A Branca-Portuguesa é raramente observada a alimentar-se e durante o presente estudo este comportamento apenas foi detectado em sete ocasiões: Duas vezes, das flores de *Lobularia marítima* (Cruciferae) na Serra da Arrábida, duas vezes, sobre *Iberis ciliata contracta* (Cruciferae) na Serra da Adiça e em uma ocasião em *Calendula suffruticosa algarbiensis* (Asteraceae) na Serra da Arrábida e *Rosmarinus officinalis* (Labiatae), na Serra da Arrábida.

### **Plantas alimentícias e oviposição**

Durante as prospecções de campo não foi possível observar quaisquer fêmeas de *E. tagis* em oviposição. Contudo, em diversas ocasiões detectou-se a presença de ovos e lagartas nas plantas alimentícias disponíveis.

#### **Ovos**

Dois ovos em 2-IV-2008 na Serra da Adiça em *Iberis ciliata contracta*. Um na porção distal de uma folha terminal e outro na parte inferior de uma das flores dos bordos da inflorescência, ainda em botão. Outro ovo foi localizado em 23-IV-2008 na Serra da Adiça, na face inferior da inflorescência de *I. ciliata contracta*. (Em Gibraltar, seis ovos foram observados na face inferior da inflorescência de uma planta de *Iberis gibraltarica* e um na zona terminal de uma folha em 12-IV-2009.)

#### **Lagartas**

Uma larva de 2º instar (L2) alimentando-se de uma folha terminal de *Iberis ciliata contracta* na Serra da Adiça. (2-IV-2008), outra de de 3º instar (L3) alimentando-se da inflorescência de *Iberis procumbens microcarpa* na Serra dos Candeeiros. (1-VI-2008) e uma larva em 3º instar (L3) alimentando-se na inflorescência

em botão de *Iberis procumbens microcarpa* na Serra da Arrábida. (19-IV-2009) foram observadas no decorrer deste estudo.

Em cativeiro, três fêmeas (uma proveniente da Serra da Adiça e duas do Anticlinal de Estremoz) foram levadas a concluir a oviposição numa gaiola de madeira com paredes de rede de cor neutra construída para o efeito e colocada ao ar livre. Foi a partir dos ovos depositados por estas que se procedeu ao seguimento e caracterização das diversas fases que não foram encontradas durante o trabalho de campo, nomeadamente os primeiros dois instares.

### 3.2.3 Morfologia dos estádios pré-imaginais

Os Lepidoptera apresentam um ciclo-de-vida tetramórfico em que se distinguem as fases de ovo, larva do tipo eruciforme, pupa obtecta e imago geralmente voador. Os ovos exibem uma ultraestrutura complexa e por vezes ornamentada. As larvas apresentam uma estrutura morfológica e ecologia muito diferenciadas dos adultos e os grupos mais “evoluídos” são geralmente fitófagos (*p. ex.* Gimaldi & Engel, 2005).

Como referido no capítulo 2, as fases pré-imaginais foram mantidas em cativeiro em condições semelhantes às naturais e nas plantas alimentícias nas quais foram encontradas ou quando obtidas em cativeiro, na planta alimentícia característica da população de onde provinham. O ciclo de vida foi seguido e caracterizado quanto a características morfológicas a comportamentais. Até ao presente estudo, não estavam descritos quaisquer ínstares larvares para a Península Ibérica, à excepção do último (L5).

#### **Ovo**

Tal como amplamente documentado (ver Capítulo 1.5.6), possui uma forma típica dos Pierinae e é inicialmente de cor branca a amarelada, passando a laranja e finalmente a castanho antes da eclosão da lagarta, que emerge a partir da zona micropilar localizada no topo. Em liberdade os ovos foram sempre encontrados isoladamente apesar de em duas ocasiões terem sido encontrados vários por planta alimentícia. Em cativeiro, as borboletas puseram ovos sempre que se depararam com a planta alimentícia chegando a colocar vários ovos na mesma folha, embora cada oviposição de um ovo preceder um período de voo de duração variável. (Anexo VIII, Fig. 29a,b). Desde a postura até ao nascimento das lagartas L1 decorreu um período de tempo médio de aproximadamente 4 dias ( $N=34$ ,  $\Delta = \pm 1$  dia). À passagem do quarto dia,

os ovos alteram a sua coloração alaranjada para castanho acinzentado escuro sendo que a região distal se tornou mais escura.

### **1º Instar**

A lagarta eclode a partir da parede lateral do ovo e geralmente não come o córion após a emergência. Inicialmente é amarela e tem a cápsula cefálica completamente negra. Apenas possui sedas primárias por todo o corpo e estas acumulam gotículas transparentes na extremidade. A placa protorácica é pouco esclerotizada (Anexo VIII, Fig. 29c,d,e). Alimenta-se nas imediações de onde foi colocado o ovo, seja uma folha ou um botão floral durante uma média de 3 dias ( $N=34$ ,  $\Delta = \pm 0,5$  dias).

### **2º Instar**

Similar ao estágio anterior mas a lagarta adquire uma coloração mais esverdeada. A cápsula cefálica é ainda negra, enquanto os restantes segmentos possuem coloração de fundo amarelo esverdeada e sedas corporais cobertas de gotículas transparentes. Ao nível dos espiráculos é possível distinguir uma linha longitudinal mais clara que percorre todo o corpo. Patas torácicas da mesma cor que a cápsula cefálica (Anexo VIII, Fig. 29f). A duração média do 2º instar é de 3 a 4 dias ( $N=33$ ,  $\Delta = \pm 0$ ).

### **3º Instar**

A transição das fases mais precoces (L1 e L2) para a larva madura envolve geralmente uma alteração para um padrão semelhante ao final e uma multiplicação das sedas pequenas que cobrem o corpo todo da maioria dos Pierinae. Aqui dá-se uma maior alteração morfológica: a cápsula cefálica passa a ser amarelo-esverdeada e o corpo da larva torna-se verde pontilhado de preto. Estes pontos correspondem à zona de inserção das sedas primárias (e agora também secundárias) que são agora proporcionalmente mais curtas e espessas e ainda apresentam gotículas transparentes na extremidade, especialmente na região dorsal. A linha lateral ao nível dos espiráculos torna-se mais conspícua e é ladeada por outra pouco visível e levemente azulada, em posição mais dorsal. Na cápsula cefálica são agora bem visíveis 6 ommatidia individualizados. As patas torácicas são verdes, da mesma cor do corpo (Anexo VIII, Fig. 30a-e). Esta fase dura cerca de 3 a 4 dias ( $N=30$ ,  $\Delta = \pm 1$ ) e a lagarta move-se

voluntariamente para outras folhas ou flores nas imediações, tendencialmente para os corimbos florais onde os botões florais são consumidos centriptamente.

#### **4º Instar**

À passagem dos 14-15 dias desde a postura, as larvas sofrem a transformação para o 4º instar. Neste estágio a lagarta é verde com uma linha longitudinal espiracular de cor branca como no instar anterior mas sobre a qual se distingue melhor a linha azulada, ainda indefinida. A forma é eruciforme e regular até à região anal onde se deprime. Todo o corpo se encontra coberto de sedas negras. Ao contrário das outras espécies simpátricas nos géneros *Euchloe* e *Pontia*, as sedas primárias dorsais não adquirem uma configuração longa e rígida, mantendo-se do mesmo tamanho ao longo do desenvolvimento larvar. Contudo, estas ainda contêm gotículas transparentes na zona terminal. A cabeça é verde com finos pontos pretos, correspondentes à zona de inserção das sedas e as patas torácicas são verde escuras enquanto os pseudópodes são da cor do corpo (Anexo VIII, Fig. 30f). Este instar dura aproximadamente 3 dias ( $N=25$ ,  $\Delta = \pm 0,5$ )

#### **5º Instar**

No 5º instar aparece o padrão definitivo e característico da espécie representado por uma coloração verde generalizada em todo o corpo, excepto na linha longitudinal lateral de cor branca que engloba os espiráculos, da mesma cor e ladeada em posição mais dorsal por uma linha cor-de-rosa vivo. Acima desta linha existe outra mais difusa de cor violeta. Estas três linhas laterais atravessam todos os segmentos desde a cápsula cefálica ao último urito. A cabeça é verde, de coloração azulada na zona lateral entre o semi-círculo formado pelos 5 ommatidia. Tanto a cabeça como o corpo estão densamente cobertos por sedas curtas de cor negra na região dorsal e branca na zona ventral. Tanto os pseudópodes como as patas torácicas são verdes (Anexo VIII, Fig. 31a-f). Tanto nesta como em todas as outras fases anteriores do desenvolvimento e apesar das lagartas terem sido mantidas em contacto com outras, não se registaram episódios de canibalismo.

Esta fase dura aproximadamente 4 dias ( $N=25$ ,  $\Delta = \pm 2$ ) e quando está prestes a pupar a coloração da lagarta totalmente desenvolvida altera-se dramaticamente: a coloração verde é totalmente substituída por carmim, ficando a linha branca lateral muito contrastada (Anexo VIII, Fig. 32a). Em seguida a lagarta deixa de se alimentar e procura um local para pupar. Segundo os dados disponíveis, pode pupar na própria



planta alimentícia ou na vegetação adjacente, não obrigatoriamente sobre assembleias (13 das lagartas disponíveis puparam na própria planta alimentícia, 12 distanciaram-se da mesma até aproximadamente 2 metros de distância).

Após ter seleccionado um local apropriado e tal como as outras espécies da família Pieridae elabora uma almofada de seda onde fixa os pseudópodes anais e um cinto de seda em torno da região torácica mantém a pré-pupa no lugar. Após umas horas o tórax dilata-se e à transparência são visíveis a venação das futuras asas por baixo da cutícula (Anexo VIII, Fig. 32b) e após cerca de 1 dia, dá-se a ecdise final, transformando-se em pupa (Anexo VIII, Fig. 32c-f).

### **Pupa**

A pupa é afilada na região cefálica inicialmente de cor carmim mas ao final de cerca de um dia torna-se castanho-clara a cor de marfim com algumas marcas negras (Anexo VIII, Fig. 32c-f). Segundo os dados disponíveis, com pupas de todas as populações estudadas (Serra da Arrábida, Serra da Adiça, Anticlinal de Estremoz, Serra Candeeiros e Gibraltar), a variação interpopulacional é reduzida. As manchas negras são essencialmente de 5 tipos: 1) Mancha preta na região distal da célula da asa anterior; 2) pintas pretas ao longo dos espaços da zona pós-mediana de toda a asa anterior; 3) linha preta dorsal proeminente entre o primeiro segmento torácico e o oitavo segmento abdominal; 4) linha preta na região interior da asa anterior, pouco proeminente e 5) mancha linear entre a placa ocular e a asa anterior.

As pupas que se formaram a partir de lagartas em 2008 não emergiram na primavera de 2009, mantendo-se vivas pelo que se depreende que irão emergir ou em 2010 ou mais tarde. Deste modo, apesar de ser expectável que o pudessem fazer, como é típico no género *Euchloe* (*p. ex.* Opler, 1974), tal não pôde ser verificado neste estudo por constrangimentos temporais.

#### 3.2.4 Características do estado adulto em Portugal

Os dados referentes aos indivíduos adultos provêm das capturas e observações durante este trabalho ou dos dados constantes na bibliografia. Dado que a caracterização morfológica geral do imago de *E. tagis* se encontra amplamente difundida, será apenas de realçar as diferenças entre as diversas populações portuguesas.

A subespécie nominal *E. t.tagis* é actualmente considerada a forma que habita as serras da Arrábida e São Luís, na península de Setúbal, em Portugal. Contudo, segundo Olivares & Back (2004), todas as populações do sudoeste da península Ibérica estão incluídas neste taxon, o que abarca então as populações do sudoeste de Espanha (*E. t. davidi*), entre Cádiz e Huelva. Este taxon é caracterizado por:

- 1) Manchas brancas reduzidas na face inferior da asa posterior;
- 2) Fundo da face inferior das asas posteriores verde-oliva a verde amarelado;
- 3) Escamas negras abundantes na base, região costal e ápice da face superior da asa anterior;
- 4) Face superior da asa anterior de cor branca;
- 5) Grandes dimensões, em que o comprimento da asa anterior supera 20 mm;

Considerando estes caracteres e outros disponíveis na literatura, e à falta de uma atribuição imediata das novas populações descobertas aos *taxa* previamente conhecidos, torna-se relevante a sua caracterização morfológica. Além da importância que os caracteres morfológicos têm tido ao longo da história ao nível da sistemática e classificação formal da biodiversidade, em última análise é sobre estes que actua a selecção natural. Como representam muitas vezes alterações no fundo genético de uma determinada população, podem ser utilizados como uma medida de diferenciação e traduzir adaptações locais e distância genética entre populações alopátricas.

A título de exemplo, o formato geral das asas anteriores é de especial importância para a mecânica de voo das borboletas já que a estrutura e formato das asas condiciona o aerodinamismo de forma dramática (Strauss, 1990). Deste modo, espécies ou exemplares com asas anteriores mais afiladas terão maior facilidade em voar sob ventos mais intensos ou percorrer maiores distâncias em virtude do seu maior aerodinamismo.

Quando em repouso, a Branca-Portuguesa fecha as asas posteriores sobre as anteriores em posição vertical, como a maioria das borboletas diurnas. As asas posteriores, maioritariamente verdes, cobrem completamente as asas anteriores, excepto o ápice. A coloração da asa posterior (a intensidade do verde e a proporção de manchas brancas) deverá estar relacionada com a camuflagem das borboletas em repouso pelo que deverá estar estreitamente correlacionada com as comunidades vegetais predominantes e os habitats em geral. Torna-se assim critério de diferenciação facilmente identificável e com valor adaptativo.

### População das Serras da Arrábida e São Luís

As borboletas desta população são geralmente de dimensões médias (comprimento da asa anterior cerca de 20 mm), face superior das asas anteriores de cor branco-puro onde a mancha negra da célula é grande e bem definida, a região basal apresenta escamas negras abundantes e o ápice é negro, com manchas brancas de dimensão variável. Nas asas posteriores, a face superior é uniformemente acinzentada enquanto na face inferior dá-se uma redução acentuada quer do número, quer das dimensões das manchas brancas, sobre um fundo uniformemente verde seco a verde amarelado em toda a extensão alar (concentração de escamas negras sensivelmente semelhante à de escamas amarelas) (Anexo IX, Fig. 33a-d). As fêmeas são usualmente de maiores dimensões, o formato das asas é mais largo e as marcas negras na face superior mais difusas.

### População da Serra da Adiça / Ficalho

As borboletas desta população são geralmente maiores que na precedente e na face superior as manchas negras possuem uma extensão variável. Contudo, na maior parte dos exemplares estas manchas são cinzentas (e não negras), isto é, a proporção de escamas brancas face às negras é superior tanto no ápice como na mancha celular, estando reduzida a área basal escura. Uma proporção assinalável de exemplares apresenta a coloração de fundo levemente amarelada como em *E. t. alhajarae* (Olivares & Back, 2004) cuja população mais próxima fica a apenas 40km de distância. A face inferior da asa posterior é de um tom claro verde amarelado, podendo ser quase amarela, a concentração de escamas negras é relativamente baixa (Anexo IX, Fig. 34b-c). Frequentemente, a metade distal da asa posterior é mais clara (mais amarela) que a metade proximal, característica que partilha também com *E. t. alhajarae* (Anexo X, Fig. 35f).

### População do Anticlinal de Estremoz

Embora se trate de uma zona extensa (cerca de 40x5 km de extensão) e de as zonas de habitat apropriado se encontrarem em bolsas mais ou menos isoladas, morfologicamente é uma população homogénea geograficamente mas polimórfica muito

variável morfológicamente. De dimensões médias análogas à população anterior, a face superior é quase uniformemente branca, as manchas podem ser negras ou cinzentas escuras, a mancha celular apresenta-se variável quanto à forma (desde rectangular a redonda ou mesmo como *E. t. calvensis*, alongada ao nível das nervuras alares). A face inferior das asas posteriores é desde verde-escura a verde amarelada uniformemente em toda a extensão, apenas cerca de 10% dos exemplares apresentam a porção distal mais clara. A área das manchas brancas é no entanto superior à encontrada nas populações anteriores apesar de variável: Se por um lado há exemplares quase sem manchas brancas como *E. t. tagis*, outros apresentam um padrão próximo a *E. t. castellana* do centro de Espanha, em que as manchas brancas são maiores e bem definidas. (Anexo IX, Fig. 34e-f).

#### Serra dos Candeeiros

Trata-se da única população portuguesa detectada a norte do rio Tejo, embora o mapa da distribuição potencial indique como provável a sua ocorrência em outros locais (Figura 14).

Esta população é distinta no que se refere ao padrão das asas. O fundo das asas anteriores pode ser ligeiramente amarelado ou branco, as manchas são negras e bem definidas e a mancha celular apresenta uma grande variabilidade na forma. De dimensões médias semelhantes às borboletas da Serra da Arrábida, estas distinguem-se fundamentalmente pela cor de fundo na face inferior das asas posteriores que é verde brilhante (“verde-alface”), constante a todos os exemplares observados (n=15). As manchas brancas são relativamente grandes (as maiores entre as populações portuguesas) e contrastadas com o fundo, apesar de terem uma aparência “esfarrapada”, contra as das outras populações que têm um formato mais regular (Anexo IX, Fig. 34a).

### 3.3 Análise genética

#### 3.3.1. Amostragem

Foram estudados um total de 90 exemplares de *Euchloe tagis*, capturados durante este projecto ou cedidos por colaboradores e provenientes de todas as grandes populações em Portugal e Espanha e duas populações de *E. tagis bellezina* do sul de França (Fig. 19). Foi ainda utilizada uma sequência de *Anthocharis cardamines* (Linnaeus, 1758) (Pieridae, Anthocharidini) (ACA001) capturada na Serra da Arrábida, Portugal e outra de *Leptidea sinapis* (Pieridae, Dismorphinae), proveniente do GenBank (FJ663719). Uma relação completa do material biológico utilizado encontra-se no Anexo IV.

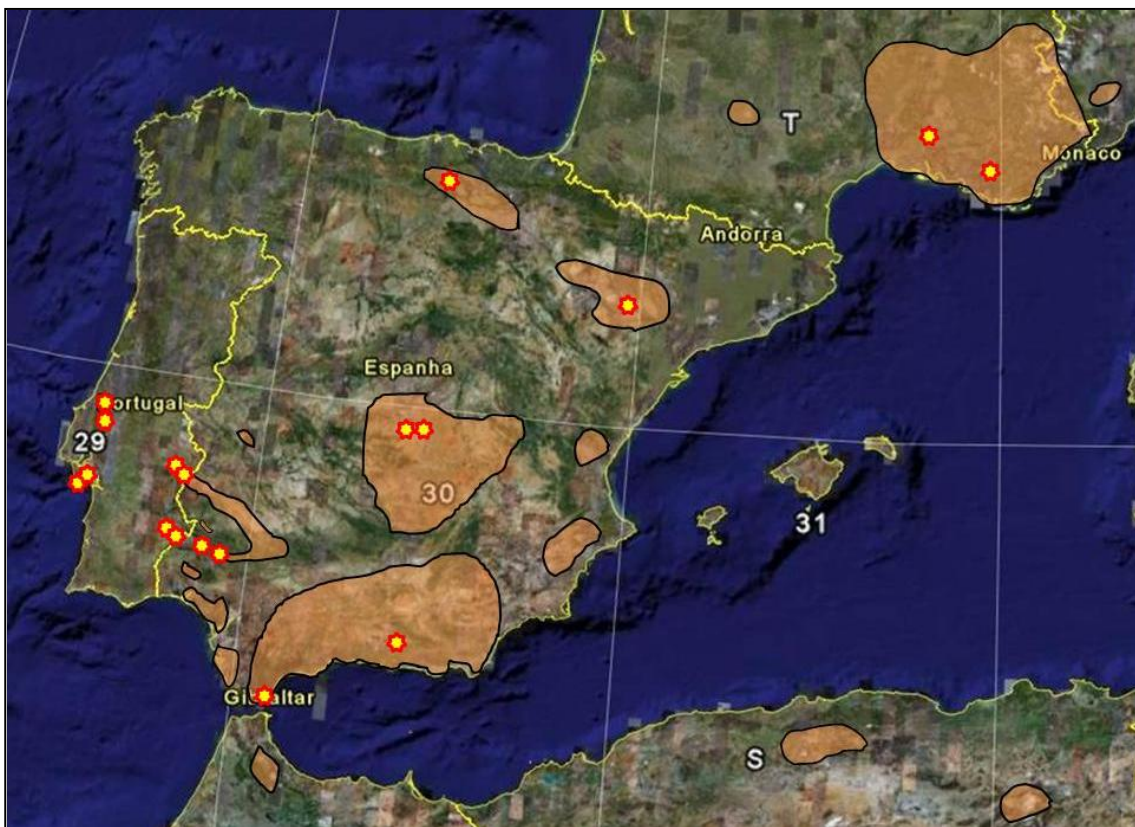


Figura 19: Distribuição das amostras utilizadas na análise genética, sobreposta à distribuição de *E. tagis* na região Atlântico-Mediterrânica. Em relação à área total de distribuição de *E. tagis*, não estão representadas as populações do centro-oeste de Itália (*E. t. calvensis*) e as populações do Atlas médio (*E. t. atlasica*).

A extração do material genético e a amplificação e sequenciação do fragmento correspondente à secção 5' do COI (Citocromo-oxidase I) foi levada a cabo de acordo com Herbert *et al.* (2003) e Hajibabaei *et al.* (2005a, b). As duas secções antiparalelas correspondentes às amplificações com os primers *forward* e *reverse* foram

emparelhadas e as bases onde não se conseguiu chegar a um consenso foram consideradas em falta (N). Contudo, apesar de a amplificação proporcionar uma cadeia de cerca de 640 pb, optou-se por apenas utilizar na análise um fragmento com 596 pb em virtude da reduzida qualidade dos cromatogramas nas extremidades dos fragmentos sequenciados. Em nenhum dos indivíduos estudados foi detectada a presença de codões stop e sendo estes indicativos da presença de pseudogenes ou de bactérias endossimbiontes do género *Wolbachia* consideraram-se as sequências e a sua diversidade como associadas à espécie.

Os 90 indivíduos provenientes de 19 localidades em 12 grandes populações de *E. tagis* podem ser agrupados em 34 haplotipos distintos, dos quais 19 foram obtidos apenas em uma ocasião (Anexo IV). A composição nucleotídica das sequências obtidas revelou um desvio, com uma maior proporção de adenina e timina face a citosina e guanina: 40% T, 29,9% A, 16% C, 14,1% G, perfazendo A+T=69,9% ( $\chi^2=17,9528$ , g.l.=3,  $p<0,0005$ ). Trata-se de um fenómeno comum no ADN mitocondrial de insectos (Simon *et al.*, 1994). O alinhamento das sequências foi efectuado sem problemas dado que não se detectou a presença de *gaps* ou *indels*. As sequências apenas de *E. tagis* revelaram a presença de 35 sitios variáveis, sendo 26 dos quais parcimoniosamente informativos (Anexo XII). Para o conjunto total de amostras, a diversidade haplotípica (h) é 0,943 e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) é 0,01058. Ao nível da cadeia de aminoácidos, registaram-se sete mutações não sinónimas, mas apenas três ocorrem em mais que um haplotipo.

### 3.3.2. Análise filogenética e filogeográfica

A maior distância genética (não corrigida) entre sequências da Branca-Portuguesa é 2,36%, entre um exemplar da região de Madrid e dois provenientes da região de Languedoc (França) apesar da distância média entre haplotipos ser de 1,06% (Anexo XII).

Enquanto a maioria dos haplotipos se encontra limitada a uma determinada área geográfica, três (H5, H21 e H25) destacam-se pela dispersão generalizada na Península Ibérica e foram os únicos localizados em populações de onde se obtiveram poucos exemplares, como Saragoça (1 indivíduo) e Granada (2 indivíduos). Os três haplotipos amostrados em França destacam-se por apenas serem encontrados neste país e a maior distância genética ocorre entre estes e todos os outros (ibéricos).

Todas as análises filogenéticas atribuem à espécie *E. tagis* um carácter monofilético, marcadamente diferenciado dos grupos exteriores. Contudo, transversal a todos os métodos de inferência filogenética é também a prevalência de politomias já que as diferenças entre os haplotipos não revelam um marcado padrão geográfico. Assim, apenas é aparente a existência de um padrão geral de diferenciação genética de *E. tagis* em três grandes haplogrupos (França+Clade1+Clade2), encontrando-se as subdivisões encontram-se mal resolvidas a um nível mais basal. O haplogrupo francês destaca-se sempre pela sua consistência, seja a sua origem precedente das restantes subdivisões ou a par da politômica subdivisão geral (Figuras 20-24).

Na árvore obtida pela análise Bayesiana (Fig. 20) destaca-se a extensa politomia ao nível basal, de onde emergem associações robustas entre os haplotipos de França (H1, H2 e H3: com valor de credibilidade de 95), o *clade* onde se inserem três haplotipos da Sierra de Alajar e um do Anticlinal de Estremoz (H8+H9+H10+H11, credibilidade de 94) e uma associação entre um grupo de haplotipos presentes na Serra da Adiça e no Anticlinal de Estremoz (H16 e H17). Quase todos os haplotipos pertencentes às populações da Serra dos Candeeiros e Serra da Arrábida se encontram restringidos a um *clade* pouco diferenciado, em posição terminal.

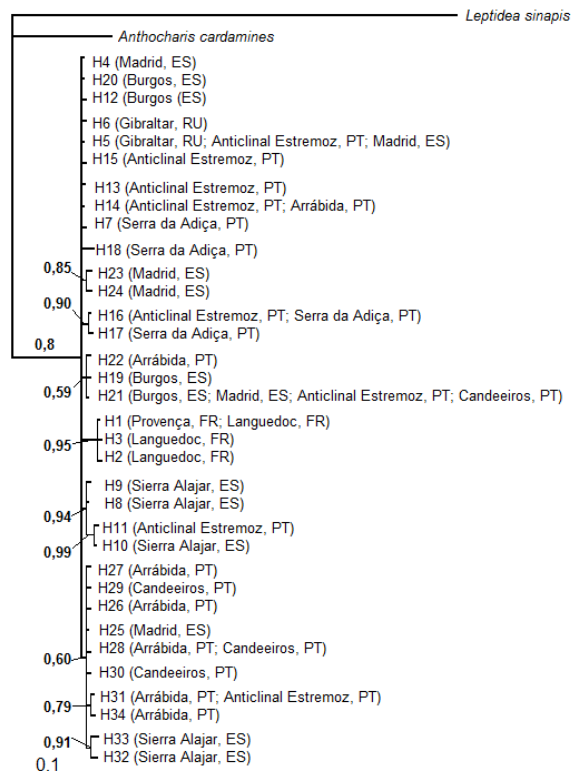


Figura 20: Árvore filogenética segundo a análise Bayesiana aos haplotipos originados pela análise do fragmento de 596 pb do gene COI. O Modelo evolutivo aplicado foi GTR+G. Os valores associados aos nodos são da probabilidade de ocorrência da associação (*posterior probability*). Entre parêntesis, encontra-se a proveniência dos indivíduos onde o haplotipo foi detectado.

Da análise de Máxima Parcimónia (MP) obtiveram-se 1392 árvores igualmente parcimoniosas, cujo consenso é apresentado na Figura 21. Deste emerge um padrão mais definido, já que o haplogrupo francês aparece como grupo irmão de todos os outros ibéricos que por sua vez se dividem em dois grandes haplogrupos. O primeiro *clade* (*clade* 1), é constituído por haplotipos provenientes fundamentalmente do sul e centro da Península Ibérica e destaca-se por incluir todos os haplotipos de Gibraltar e a maior parte da diversidade amostrada na Sierra de Alajar (Huelva, Espanha). O *clade* 2 é onde se encontra a maioria dos haplotipos amostrados e a maior distância ocorre entre os haplotipos H28 (Serra da Adiça, BAL, PT) e H33 (Madrid, ES). Todavia, dentro deste *clade* é aparente uma subdivisão já que o agrupamento formado pelos haplotipos H13-H18 aparece em posição basal, distanciados dos restantes e a coerência geográfica é substancial (haplotipos fundamentalmente da mancha calcária do interior do Alentejo, entre a Serra da Adiça e o Anticlinal de Estremoz, manchas que contactam na Extremadura espanhola). Também no *clade* 2, e tal como a análise Bayesiana sugere, surge o grupo formado pelos haplotipos H25-H34, mas acompanhado em posição mais basal dos haplotipos H20-H24 que a análise Bayesiana não agrupou.

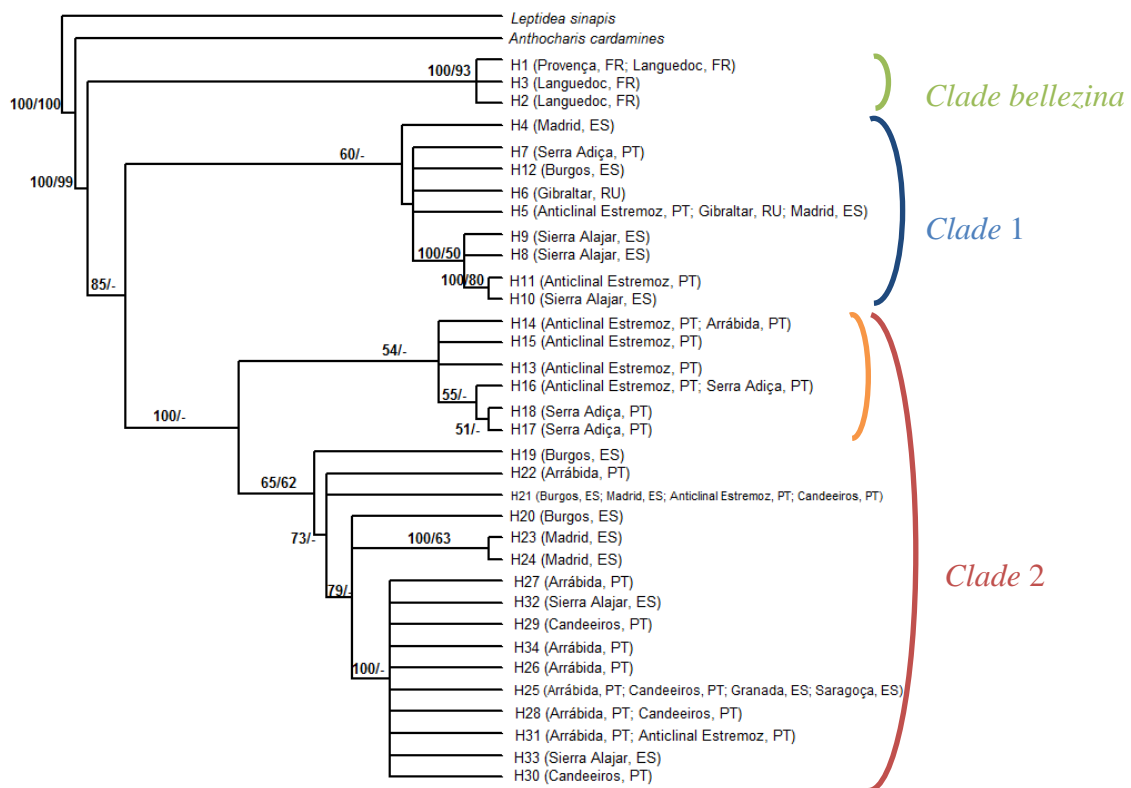


Figura 21: Cladograma de consenso segundo a análise de Máxima Parcimónia aos haplotipos originados pela análise do fragmento de 596 pb do gene COI. Os principais clades encontram-se evidenciados a cores, assim como o sub-clade meridional do Clade 2. Os números nos nodos correspondem aos valores de consenso e aos valores de *bootstrap* para 1000 replicados.



O padrão observado na análise de Máxima Verosimilhança é globalmente semelhante ao da MP, com três grandes *clades* destacados em que o *clade bellezina* se encontra mais uma vez em posição basal, sendo os haplogrupos ibéricos reciprocamente monofiléticos (Fig. 22).

O recurso à construção de uma rede de haplotipos permite visualizar espacialmente de uma forma mais eficiente as relações entre cada um dos haplotipos amostrados na Branca-Portuguesa. De acordo com a análise filogenética, são distinguíveis pelo menos três haplogrupos bem diferenciados (Fig. 23). Na rede de haplotipos o *clade bellezina* emerge como o mais distinto dos restantes, com pelo menos 6 passos mutacionais em relação ao *clade 1* e 10 em relação ao *clade 2*. No *clade 2* existem dois haplotipos mais comuns na amostra (H5 e H7) cuja dispersão é muito diferente: se por um lado o H5 se encontra disperso pelo sul peninsular, o H7 é à partida exclusivo da Serra da Adiça. A estes associados estão haplotipos amostrados em baixa frequência mas diferenciados, associados à Sierra de Alajar e ao Anticlinal de Estremoz.

A união do *clade 1* ao *clade 2* é feita através de pelo menos 4 passos mutacionais sendo que a rede de haplotipos não resolve a via pelo qual terá acontecido. O *Clade 1* encontra-se intensamente estruturado e é aparente a emergência de um haplogrupo distinto com alguma equivalência geográfica (H13-18 exclusivos do Alentejo excepto uma amostra da Serra da Arrábida) e ainda um haplogrupo em “estrela” que inclui a maioria das populações periféricas da Península e alguns indivíduos de populações mais interiores (H25-34). A representação geográfica da frequência das três principais linhagens (Fig. 24) apenas permite verificar mais uma vez o isolamento da *clade bellezina* em França mas uma dispersão geral ibérica do *clade 2*, sendo predominante pelo menos no oeste e no norte, ao passo que no sudoeste da Península Ibérica a frequência da *clade 1* é superior, sendo a única verificada na população de Gibraltar (para a representação de cada população na rede haplotípica, ver Anexo XII, Fig. 37).

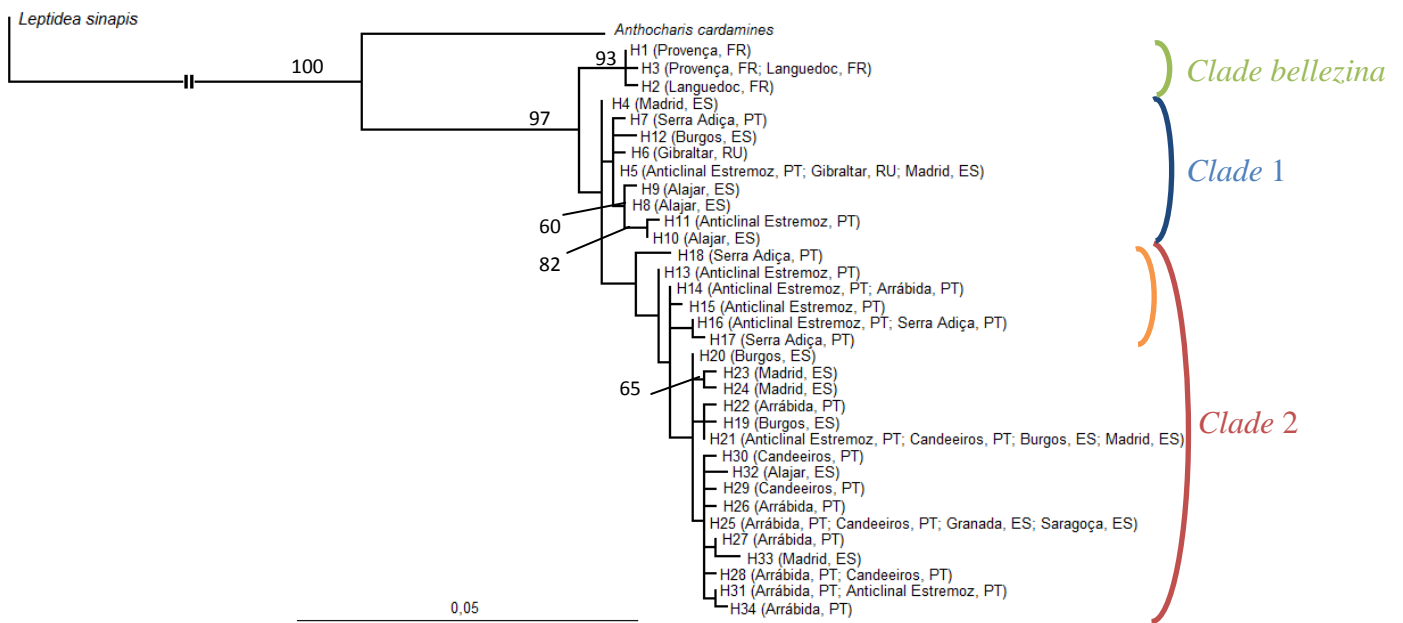


Figura 22: Árvore filogenética de Máxima Verosimilhança (ML) aos haplotipos originados pela análise do fragmento de 596 pb do gene COI. O modelo evolutivo aplicado à análise foi GTR+G+I. Os números nos nodos correspondem aos valores de *bootstrap* para 1000 replicados.

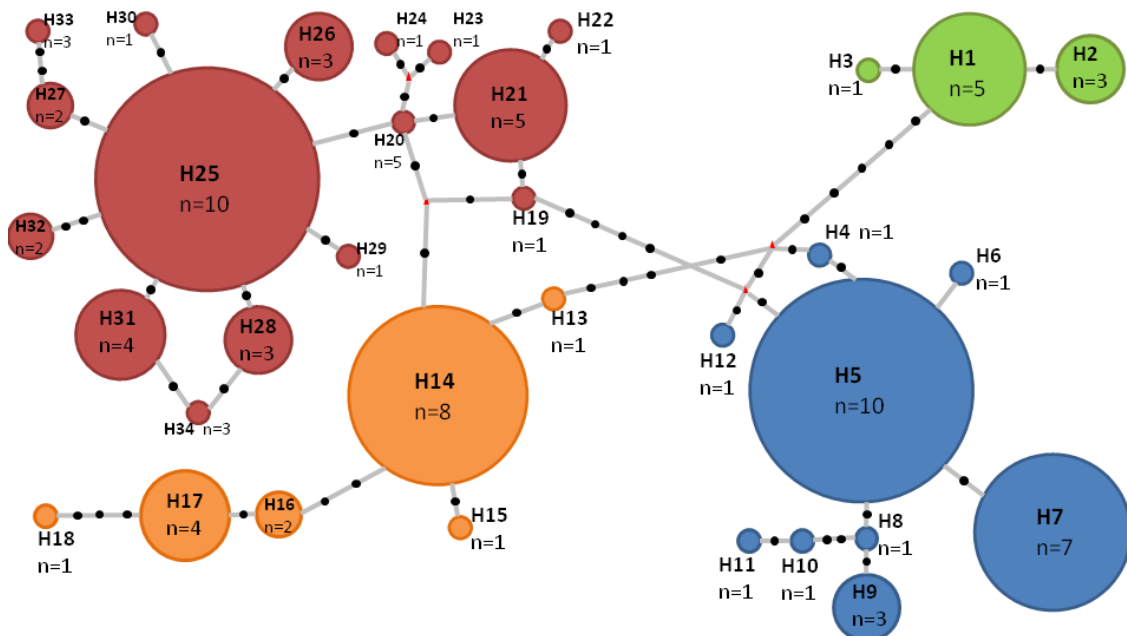


Figura 23: Rede de haplotipos formada pelo método de *Median Joining*. O diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho da amostra. As cores representam os *clades* discriminados na análise filogenética. No *clade 2* por uma diferenciação pictográfica da linhagem do sul, a laranja.



Figura 24: Representação da frequência das três principais linhagens de haplotipos verificadas na análise filogenética e rede de haplotipos. O diâmetro dos gráficos circulares não está à escala com o número de amostras, que no entanto está representada em cada porção do gráfico.

### 3.3.3. Genética populacional

A distribuição dos 34 haplotipos presentes nas diferentes populações de *E. tagis* encontra-se discriminada no Quadro I.

Quadro I: Distribuição dos haplotipos em cada população, estando representados também o número de amostras incluídas.

HAPLOTIPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	total
Estremoz					5							1	1	7	1	1					1														20
Adiça							7									1	4	1																	13
Arrábida														1							1				4	3	2	1		1				1	14
Candeeiros																					1					3		2	1	1				8	
Alajar								1	3	1																								2	7
Madrid				1	1																2		1	1										1	7
Granada																										2								2	
Gibraltar					4	1																												5	
Burgos													1							1	1	1												4	
Saragoça																										1								1	
França	5	3	1																															9	
TOTAL																																			

19 haplotipos foram detectados apenas uma única vez, enquanto 27 haplotipos são exclusivos a qualquer das populações. No que toca à fixação dos haplotipos nas populações em estudo, a maioria revela uma composição diversa, sendo as excepções notáveis as populações de Caspe (Saragoça, ES) e Sierra Elvira (Granada, ES), claramente por falta de amostragem. As medidas de diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) encontram-se representadas no Quadro II.

Quadro II: Os haplotipos e medidas de diversidade haplotípica e nucleotídica.

Pop \ Hapl	Individuos.	#hap	únicos	% unicos	$h$	$\pi$
Estremoz	20	8	3	37,5	0,821	0,007815
Adiça	13	4	3	75,0	0,654	0,009151
Arrábida	14	9	5	55,6	0,890	0,003337
Candeeiros	8	5	3	60,0	0,857	0,002397
Alajar	7	4	4	100,0	0,810	0,010706
Madrid	7	5	3	60,0	0,952	0,009907
Granada	2	1	0	0,0	0,000	0
Gibraltar	5	2	1	50,0	0,400	0,000671
Burgos	4	3	2	66,7	1,000	0,006152
Saragoça	1	1	0	0,0	0,000	0
França	9	3	3	100,0	0,639	0,001212

Tanto os valores de diversidade haplotípica como de diversidade nucleotídica se revelaram altos para a maioria das populações, a excepção continuando a ser as populações de Granada e Saragoça, devido à amostragem deficiente e as populações de França e Gibraltar. Entre as populações com maior variabilidade destacam-se de uma forma geral as do interior da Península Ibérica (Madrid, interior do Alentejo).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) permite inferir sobre os padrões de sub-divisão e estrutura nas populações através de descritores análogos às estatísticas  $F$  aplicados aos dados de sequências. Agrupou-se as populações com base na estruturação evidenciada na análise filogenética mas também se optou por realizar outros tipos de agrupamentos com o objectivo de evidenciar outras possíveis associações e o fluxo genético na base da estruturação evidenciada. Os diversos arranjos assim como as estatísticas  $\phi$  apresentam-se no Quadro III.

Quadro III: Análise de Variação Molecular entre populações de *Euchloe tagis*, com indicação dos índices de fixação assim como a percentagem de variação total explicada pelo agrupamento.

Grupos	$\phi_{st}$	$\phi_{sc}$	$\phi_{ct}$	% var
[França] [Iberia]	<b>0,6798</b>	<b>0,3543</b>	<b>0,5042</b>	50,41
[França] [Arrabida, Candeeiros] [iberia]	0,5608	<b>0,2476</b>	0,4162	41,62
[França] [Arrabida, Candeeiros, burgos, Madrid, Saragoça, Granada, Estremoz] [Gibraltar, Alajar, Adiça]	0,5578	0,2207	0,4326	43,26
[França] [Arrabida, Candeeiros, Granada] [Madrid, Burgos, Saragoça] [Alajar, Adiça, Estremoz] [Gibraltar]	<b>0,5115</b>	0,1385	0,4329	43,29
[França] [Arrabida, Candeeiros, Granada, Saragoça] [Estremoz, Madrid, Burgos] [Alajar, Adiça] [Gibraltar]	0,5078	0,1728	0,4050	40,5
[França] [Arrabida, Candeeiros, Granada] [Estremoz, Madrid, Burgos, Saragoça] [Alajar, Ficalho] [Gibraltar]	0,5023	0,0963	<b>0,4493</b>	44,93

No primeiro arranjo procurou-se comprovar a divergência verificada na análise filogenética e na rede de haplotipos entre as populações francesas (*E. t. bellezina*) e as populações ibéricas (diversas subespécies) sendo o critério de escolha não só o isolamento peninsular das últimas como o estatuto taxonómico. Os valores observados são relativamente altos e este arranjo, que é o melhor, explica cerca de 50% da variação genética entre as populações de *E. tagis* na área de estudo. Todas as outras associações apresentam uma variação menor entre grupos apesar de se terem testado grupos à partida válidos do ponto de vista teórico.

Assim, o segundo arranjo representa o isolamento das populações do extremo oeste peninsular face às francesas e restantes e o terceiro pretende averiguar a separação entre um *clade* predominantemente do sul e do interior que é discernível na análise filogenética e as restantes. Do quarto ao sexto arranjos, a separação foi testada com base na associação fenotípica entre as diferentes subespécies (*E. t. tagis* + *E. t. granadensis*, *E. t. bellezina*, *E. t. castellana*, *E. t. alhajarae* + Alentejo, Gibraltar), testando a posição de charneira do Anticlinal de Estremoz entre as subespécies *E. t. alhajarae* e *E. t. castellana*.

## DISCUSSÃO

*Euchloe tagis* é uma espécie Atlântico-Mediterrânica cuja distribuição global é essencialmente europeia e pode ser moderadamente explicada com base em variáveis abióticas e que, segundo os piores cenários de alterações climáticas, se estima que perca a sua área de distribuição actual em cerca de -87% em 2080 (Settele *et al.*, 2008). O incremento de 400% da área de distribuição conhecida da espécie em Portugal durante este estudo reveste-se de especial interesse neste contexto na medida em que releva a importância de Portugal na conservação e manutenção das populações desta espécie.

A distribuição da Branca-Portuguesa pode todavia ser modelada com fiabilidade recorrendo a apenas duas variáveis: a presença de zonas rochosas calcárias e de plantas alimentícias, crucíferas do género *Iberis*. De facto, na associação destas duas variáveis inferiu-se que seria mais provável a descoberta da espécie no interior do Alentejo (Serra da Adiça, Anticlinal de Estremoz) e Maciço Calcário Estremenho, o que eventualmente se veio a verificar mas também na Serra da Boa Viagem, arredores de Peniche e no Barrocal Algarvio, o que não pôde ser comprovado. No entanto, a cartografia das plantas alimentícias é ainda incompleta ao nível de detalhe adequado para um modelo de distribuição mais eficiente e o trabalho de campo envolveu apenas três períodos de voo da espécie, numa área muito vasta. Assim, as “ausências confirmadas” deverão no entanto ser interpretadas com prudência e mais estudos deverão ser direccionados para zonas como o Barrocal Algarvio ou a área entre a Serra dos Candeeiros e a Serra da Arrábida. A localização de novas populações não deve ser afastada mesmo após este trabalho em virtude do parco conhecimento geral da Lepidopteroфаuna de Portugal. Se por um lado a lista de espécies tem sofrido um incremento sem paralelo (Marabuto, 2003; Marabuto *et al.*, 2004; Corley *et al.*, 2007; Corley *et al.*, 2008; Marabuto & Maravalhas, 2008), o conhecimento sobre a ecologia das espécies em território nacional é praticamente nulo, representando este estudo o mais aprofundado sobre qualquer espécie de Lepidoptera em Portugal até ao presente.

A um nível maior de detalhe, todas as zonas onde se detectou a presença de *E. tagis* partilham algumas características que definem um “Habitat de *Euchloe tagis*”:

- 1) Presença das plantas alimentícias do género *Iberis*. Em Portugal a Branca-Portuguesa apenas foi detectada em áreas onde ocorrem *Iberis ciliata contracta* ou *Iberis procumbens microcarpa*. Contudo, uma população em Espanha

alimenta-se de *Iberis ciliata welwitschii* (entre Huelva e Doñana, Andaluzia), surgindo em arenitos consolidados zonas de solos leves arenosos perto do litoral pelo que a prospecção de *E. tagis* nestes habitats em Portugal, nomeadamente no sotavento algarvio e na Bacia do Sado.

- 2) Substrato de rochas carbonatadas, nomeadamente calcários dolomíticos e dolomitos cuja geomorfologia é acidentada e se destaca das áreas envolventes.
- 3) Os Habitats onde foi detectada a presença de *E. tagis* caracterizam-se sempre pela presença das etapas sub-seriais fortemente heliófilas de degradação do bosque mediterrânico de *Quercus faginea* (*Arisaro-Quercetum broteroi*) ou *Quercus rotundifolia* (*Myrto-Quercetum rotundifoliae*), sendo privilegiadas áreas de ecótono e mosaico. As plantas alimentícias desenvolvem-se em maior abundância nas clareiras e zonas mais pedregosas.

Devido a estas condicionantes, algumas localidades para onde a espécie se encontra referenciada suscitam dúvidas da sua veracidade pela ausência comprovada de qualquer destes factores, como é o caso do barlavento algarvio. Quanto à população de onde a espécie foi originalmente descrita, na zona da Cova da Piedade, Alfeite e Cacilhas, é de prever que esta se tenha extinguido devido à perda de habitat para a urbanização desta região inserida na Área Metropolitana da grande Lisboa.

Os habitats de *Euchloe tagis* podem ser enquadrados em cerca de 8 Habitats Prioritários para a Conservação segundo a rede NATURA 2000. De acordo com o Plano Sectorial da Rede Natura 2000 (ICN, 2006), o estado de conservação dos mesmos é variável mas, de um modo geral, as etapas mais avançadas na sucessão ecológica (habitats 6110, 9340) estão mais confinadas, são mais raras e encontram-se mais ameaçadas que as etapas iniciais na sucessão do carvalhal calcícola (habitats restantes).

As principais ameaças às populações de *E. tagis* em Portugal incluem fundamentalmente o efeito recorrente do fogo e da exploração de inertes. Os fogos nos matos calcícolas ocorrem em todas as zonas de ocorrência de *E. tagis* e têm um efeito rejuvenescedor nas formações vegetais que recuperam rapidamente (Clemente *et al.*, 1996), mas a intensidade e periodicidade têm vindo a aumentar em Portugal (Catry *et al.*, 2008), tendo um efeito mais marcado na Serra da Arrábida e no Maciço Calcário Estremenho, onde o habitat disponível é hoje fragmentado e reduzido. A exploração de inertes na Serra da Arrábida (onde as pedreiras abarcam uma grande área de habitat potencial), na Serra dos Candeeiros (onde se encontram dispersas por toda a área) e no Anticlinal de Estremoz (tornando o habitat potencial exíguo e com reduzida

conectividade), representam uma das ameaças mais importantes para a conservação de *E. tagis*. A nível local, a expansão dos olivais de regadio em produção intensiva na Serra da Adiça e no Anticlinal de Estremoz é incompatível com a presença da Branca-Portuguesa e constitui uma ameaça séria, assim como o corte da vegetação nas bermas das estradas da Serra da Arrábida durante o período de voo e oviposição da borboleta. Globalmente, as ameaças sobre as populações e os habitats de *E. tagis* incluem também a pressão devido à pastorícia (Tarrier & Delacre, 2008) e o aumento da urbanização (Olivares & Back, 2004).

Todas as áreas de ocorrência em Portugal, excepto o Anticlinal de Estremoz, estão abrangidas por algum estatuto de protecção, o que oferece mais garantias à sua conservação. A Serra da Arrábida e a Serra de São Luís estão abrangidas pelo sítio NATURA 2000 “Arrábida – Espichel” PTCON0010 sendo a primeira ainda Parque Natural. A Serra dos Candeeiros está incluída no Parque Natural das Serras de Aires e Candeeiros e no Sítio NATURA 2000 “Serras de Aire e Candeeiros” PTCON0015. A Serra da Adiça está incluída no Sítio NATURA2000 “Moura-Barrancos”, PTCON0053.

A conservação de *E. tagis* em Portugal é ainda mais premente tendo em consideração que os seus habitats albergam uma elevada biodiversidade. De acordo com van Swaay *et al.*, (2006), as zonas calcárias (prados e zonas de matos calcícolas) são os habitats mais ricos em espécies de borboletas a nível europeu, albergando cerca de 274 espécies, das quais cerca de 14% está ameaçada. Estes habitats são igualmente ricos em outros grupos taxonómicos, especialmente insectos e plantas. Entre as últimas, é de realçar um grupo carismático, as orquídeas (Orchidaceae), que têm nas zonas calcárias de vegetação esclerófila do sul da Europa um importante centro de endemismo e de diversidade (*p. ex.* Sundermann, 1980; Tyteca, 1998). Finalmente, a conservação destes habitats reveste-se de especial importância uma vez que é da Serra da Adiça que provém o último registo de lince-ibérico (*Lynx pardina* Temminck, 1824) em Portugal (Santos-Reis, 2003). A existência de outras espécies emblemáticas nos habitats de *E. tagis* reforça a importância dos mesmos e permite que seja considerada como uma “espécie bandeira”, e a maior detectabilidade e facilidade de estudo desta espécie tornam-na a candidata ideal para “espécie guarda-chuva” destes habitats.

Os estudos morfológicos dos estádios pré-imaginais em Lepidoptera são na sua globalidade escassos, principalmente quando comparados com o conhecimento



disponível sobre a identificação do estado adulto e a sua biologia geral. A Branca-Portuguesa constitui mais um exemplo destes e o seu estudo morfológico resulta num aumento do conhecimento necessário para a identificação prática das diferentes fases em relação a outras espécies de Pieridae. Este estudo tem além do mais um valor sistemático já que a informação morfológica e ecológica pode ser utilizada em estudos taxonómicos e acções de conservação.

De uma forma geral o desenvolvimento dos estádios pré-imaginais de *E. tagis* em Portugal não difere substancialmente das outras espécies do género *Euchloe* nem se demarca do conhecimento existente sobre a espécie (Opler, 1974; Huertas Dionisio, 1986; Olivares & Back, 2004). Neste contexto é de especial relevância a diferença entre o padrão apresentado pelas larvas de último instar, diferente de todas as outras espécies do género *Euchloe* no Paleártico e análogo às espécies neárticas do “grupo hyantis”, (*E. lotta*, *E. hyantis* e *E. guaymasensis*) (Anexo XI, Fig. 36b,d). Estas também apresentam uma coloração geralmente verde, sem linha dorsal e uma linha espiracular lateral de cor branca paralela a uma linha violeta (Opler, 1974). A par de *E. tagis*, são também espécies características de habitats xerotermófilos, possuem apenas uma geração anual e são selectivas nas plantas alimentícias. Por exemplo, *E. hyantis* e *E. lotta* alimentam-se preferencialmente de crucíferas perenes dos géneros *Streptanthus* e *Caulanthus*, plantas hiperacumuladoras de metais pesados de marcadas preferências por solos serpentínicos e calcários.

Segundo Opler (1974), em *E. hyantis* os ovos são facultativamente postos nas flores ou porções distais das folhas em desenvolvimento, ao contrário das outras espécies americanas e paleárticas (que o fazem apenas nas flores), mas analogamente a *E. tagis*. As lagartas de *E. hyantis* também apresentam sedas glandulares com gotículas na extremidade, agora descobertas em *E. tagis* neste estudo. Estas gotículas foram encontradas em espécies aparentadas de Pierinae como *Pieris rapae* e *Anthocharis midea* e são compostas por mayolenos (lípidos insaturados produzidos pela lagarta) e por pinoresinol, um metabolito derivado da lenhina e sequestrado das plantas alimentícias (Smedley *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2006). As sedas glandulares apenas produzem estas gotículas nos primeiros ínstars e estudos realizados com *Pieris rapae* demonstram que têm um carácter detrador de predadores (Smedley *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2006). Contudo, dado que estes são compostos algo tóxicos (Schroeder *et al.*, 2006) e não foi detectada esta exsudação em ínstars avançados, é possível que as

larvas jovens de Pierinae, pela incapacidade de metabolização destes compostos, os tenham que excretar e a sua existência tenha uma dupla função.

Em virtude desta conexão morfológica e comportamental ao nível dos estádios pré-imaginais entre as espécies americanas do “grupo hyantis” e “*E. tagis*” e o contraste face às restantes espécies do género *Euchloe*, impõe-se um estudo filogenético abrangente geográfica e fileticamente. A existência de padrões semelhantes de coloração larvar nestas espécies com áreas de distribuição tão disjuntas poderá indicar uma relação mais estreita entre elas, o que implicaria que as espécies do género *Euchloe* não constituíssem um grupo monofilético em cada um dos continentes. Por outro lado, o padrão semelhante poderá ser resultado de uma evolução convergente para a exploração de recursos semelhantes.

Antes da fase de pupa, as lagartas adultas de *E. tagis* sofrem uma alteração da sua coloração de fundo que passa a carmim, como as outras espécies aparentadas no género, e tendem a pupar na própria planta ou nas imediações da planta alimentícia. Dado que em cativeiro das 17 pupas disponíveis após a primavera de 2008 nenhuma emergiu em 2009, é de supor que em liberdade o mesmo fenómeno ocorra sob condições sub-óptimas e a espécie possa levar vários anos até emergir (Huertas Dionisio, 1986; Caballero, 1996). É neste âmbito que se releva a importância quer da presença e uso exclusivo de espécies perenes de *Iberis spp.* quer da estruturação complexa nos habitats da Branca-Portuguesa, uma vez que a supressão da vegetação arbustiva aumenta a exposição das lagartas prestes a pupar face aos predadores e diminui o número de locais adequados. Se as plantas alimentícias não estiverem protegidas pela vegetação envolvente tornam-se também vulneráveis aos mamíferos herbívoros.

Segundo os dados obtidos, em Portugal a fase adulta tem lugar entre Fevereiro e Junho, com um pico máximo de registos nos meses de Março e Abril e um ligeiro desvio do período de voo nas diferentes populações: os últimos registos na Serra da Arrábida aparecem em Abril ou início de Maio ao passo que na Serra dos Candeeiros provêm do início de Junho.

Durante a fase adulta, machos e fêmeas demonstraram possuir comportamentos diferentes: o voo dos machos é geralmente rápido e vigoroso ao longo das linhas de cumeada e acima do solo tornando-os mais conspícuos, as fêmeas voam baixo entre a vegetação passando despercebidas e ambos os sexos raramente são observados a

alimentar-se. A origem do desvio observado emana do facto de que durante o trabalho de campo se ter procurado a maximização da detecção do número de indivíduos em detrimento da detecção de qualquer um dos sexos. Em virtude das diferenças de comportamento, é natural que a detectabilidade dos machos tenha sido muito superior; estes não só são muito mais activos em voo como se agrupam nos topos dos montes e linhas de cumeada, fazendo *hilltopping*. Este *sex-ratio* poderá ser antes interpretado como uma medida de visibilidade e não ter uma origem genética que todavia poderá ser corroborado através do desenvolvimento em cativo.

As borboletas foram localizadas quase sempre em movimento, e apesar dos habitats onde ocorrem serem notáveis pela sua diversidade e abundância em fontes de néctar, a alimentação no estado adulto revelou-se um comportamento de observação extremamente pontual e que não permite tecer considerações do ponto de vista das preferências alimentares. Contudo, dado que não emerge dos dados nenhum padrão de preferência é de supor que se trata de uma espécie eclética quanto às fontes de néctar e aproveita a disponibilidade local e sazonal.

Todos os dados ecológicos apontam para a categorização de *E. tagis* como uma estrategista S ou C (*sensu* Dennis *et al.*, 2004) – a *E. tagis* é uma especialista ecológica limitada a determinados tipos de habitat e plantas alimentícias, possui uma distribuição localizada e as menores dimensões corporais (Caballero, 1996) sugerem uma menor capacidade de dispersão que as restantes espécies com as quais ocorre em simpatria na Península Ibérica (*E. crameri*, *E. belemia*). Estas últimas apresentam uma estratégia oportunista uma vez que possuem grande capacidade de dispersão e são colonizadoras de habitats efémeros em estados iniciais da sucessão ecológica, utilizando plantas anuais de crescimento rápido para o desenvolvimento larvar (Tolman & Lewington, 1997; Savelle, 2009).

Ao contrário dos estádios pré-imaginais, as populações de *Euchloe tagis* apresentam uma grande variação morfológica ao nível do estado adulto em toda a sua área de distribuição, facto que deu origem à descrição de inúmeras subespécies, uma vez que essa variação está estruturada geograficamente. Contudo, muitas populações, maioritariamente ibéricas, ainda não foram formalmente atribuídas a qualquer uma das subespécies conhecidas (Olivares & Back, 2004). Facto reconhecido é o de que as populações desta espécie estão fragmentadas, por vezes com grandes extensões de habitat desfavorável entre elas (Casini, 1996; García-Barros *et al.*, 2004) e que esse

isolamento é em grande parte natural, isto é, depende da existência das características essenciais à sua manutenção. A diferença nos padrões alares das borboletas tem sido desde sempre considerada o critério de eleição na distinção e descrição de novas taxa, a par da utilização da genitália. Enquanto o último critério se enquadra na compatibilidade única existente entre indivíduos da mesma espécie, num sistema de “chave-fechadura” e é encarado como de evolução independente da adaptação às condições naturais (deriva genética) (Mikkola, 2008), o padrão e forma alares e a sua evolução e diferenciação têm evidentemente um valor adaptativo, sendo dependentes dos constrangimentos ambientais e sexuais (*p. ex.* Strauss, 1990; Nijhout, 1991). A avaliação dos padrões e forma das asas em populações locais de uma espécie poderá revelar um padrão de adaptação local e a ele estar associado um sinal filogenético (Anderson *et al.*, 2008).

Quando em repouso, a Branca-Portuguesa recolhe as asas verticalmente como a maioria das borboletas diurnas e a asa posterior verde cobre as asas anteriores brancas resultando na camuflagem do insecto no meio envolvente (Anexo IX, Fig. 33c). Assim, é de supor que a evolução da cor verde bem como da concentração e dimensão de manchas brancas sejam caracteres fortemente sujeitos à acção da selecção natural, como a maioria dos padrões alares em Lepidoptera (Nijhout, 1991), estando correlacionados com a vegetação nos habitats de cada população de *E. tagis*. Por outro lado, o padrão e formato alar também poderão ter evoluído como resultado da interacção entre a selecção sexual e natural e é um bom ponto de partida para a detecção de diferenças entre populações.

A população da Serra da Arrábida e São Luís está associada à subespécie típica *E. t. tagis* desde o início do seu estudo (Vieilledent, 1905; Higgins & Riley, 1983). Recentemente todas as populações do sudoeste da Península (ssp. *davidi* de Cádiz e populações do litoral de Huelva) foram também incluídas nesta subespécie em razão das semelhanças morfológicas: dimensões alares nas asas anteriores superiores a 20 mm, cor de fundo nas asas anteriores verde onde se destacam manchas brancas de pequena dimensão e manchas negras na face superior bem definidas (Olivares & Back, 2004). Com a descoberta das novas populações em Portugal surgiu a questão do seu posicionamento no contexto das subespécies ibéricas de *E. tagis* uma vez que os resultados preliminares apontam para diferenças fenotípicas face a *E. t. tagis*:

i) A população da Serra da Adiça encontra-se geograficamente próxima da recentemente descrita *E. t. alhajarae* (Olivares & Back, 2004) e o seu padrão

morfológico é semelhante, com uma coloração geral mais amarelada e a porção distal da asa posterior é mais clara que a zona proximal (Anexo IX, Fig. 34c,d). O formato das asas é em geral menos afilado que na Serra da Arrábida, especialmente nos machos. No entanto, a variação na densidade de manchas brancas e intensidade das manchas negras na face superior é considerável pelo que a título conservativo não se opta pela inclusão formal nesta subespécie.

ii) No Anticlinal de Estremoz, *E. tagis* apresenta-se variável quanto ao padrão alar. A face superior é branca e a face inferior as asas pode ser verde escura como em *E. t. tagis* ou praticamente amarela como em *E. t. alhajarae*. A densidade e dimensão das manchas brancas é variável, existindo exemplares que as apresentam reduzidas como na Serra da Arrábida e outros em que estas são maiores e mais definidas, como em *E. t. castellana* do centro de Espanha. O seu posicionamento formal é difícil de concluir em virtude da variação observada mas presume-se, com base nos dados disponíveis, que estamos perante uma variação clinal entre uma população periférica cujos caracteres estão definidos e cuja variação é negligenciável (*E. t. tagis*) e outra com características diferentes mas igualmente pouco variável (*E. t. castellana*) no centro da Península. Geograficamente em posição intermédia, a população do Anticlinal de Estremoz apresenta também um fenótipo intermédio, sofrendo ainda alguma influência do padrão observado na população da Sierra de Alajar, no sul da Extremadura espanhola e com a qual contacta através de uma longa cadeia de colinas calcárias de mais de 230 km.

iii) A única população detectada a norte do Tejo apresenta-se distinta fenotipicamente de *E. t. tagis* fundamentalmente pela coloração mais viva nas asas posteriores “verde-alface” em todos os indivíduos analisados e maiores dimensões nas manchas brancas, que aparecem mais contrastadas. Na face superior as manchas negras são bem marcadas sobre um fundo branco a ligeiramente amarelado. As dimensões alares são análogas às de *E. t. tagis* mas as asas anteriores são consideravelmente menos afiladas adquirindo a borboleta um aspecto mais compacto. Estas diferenças, aliadas ao isolamento desta população no contexto ibérico poderão justificar a sua descrição a nível sub-específico.

A análise genética às populações europeias de *E. tagis*, levada a cabo neste estudo, sugere primeiramente uma origem monofilética de *E. tagis* e uma grande diversidade genética intraespecífica na sua área de distribuição. Apesar da profusão de haplotipos e uma diversidade haplotípica média elevada, a relação filogenética entre

cada um destes haplotipos não pôde ser resolvida com grande robustez e os filogramas obtidos são em grande parte politômicos a um nível basal. Esta configuração tem lugar devido ao facto de muitos dos haplotipos diferirem uns dos outros por um reduzido número de mutações. As mesmas mutações são encontradas em populações muito distintas geografica e morfológicamente, o que indica que terão ocorrido reversões a estados ancestrais, traduzindo-se actualmente em homoplasias, tornando difícil a delimitação de um estado ancestral.

A maior e mais antiga divergência registada ocorre entre o haplogrupo formado pelas amostras de França e as restantes e destaca-se em posição basal em quase todas as análises. A reduzida diferenciação entre os três haplotipos franceses e a sua distância genética em relação aos restantes sugere não só um isolamento prolongado como a ocorrência de perda de variabilidade, principalmente quando em comparação com as populações ibéricas. Uma divergência análoga entre populações francesas e ibéricas abarcando uma área geográfica semelhante é encontrada em *Melitaea cinxia* (Wahlberg & Saccheri, 2007) e *Erebia triaria* (Vila *et al.* 2005) apesar da história filogeográfica e ecologia destas espécies serem diferentes.

Na Península Ibérica existe uma complexa relação entre os haplotipos registados e a análise filogenética apenas distingue alguns agrupamentos ao nível da coroa das árvores e em geral os valores de suporte de *bootstrap* são baixos. Contudo, evidenciam-se geralmente dois grandes *clades* diferenciados: o *clade* 1 difere em cerca de 1-1,4% do *clade bellezina* e o *clade* 2 difere em pelo menos 1,5% (1,5-2%) do *clade bellezina*. A diferença entre estes dois *clades* ibéricos é análoga, com valores mínimos na ordem de 0,8% de diferença nas sequências analisadas. A segunda sub-divisão nas populações de *E. tagis* terá ocorrido entre os ancestrais do *clade* 1 e o *clade* 2 já na Península Ibérica não sendo de descartar a hipótese de uma subdivisão em três grupos distintos praticamente simultânea dada a grande diferenciação entre os dois *clades* ibéricos.

Nas populações ibéricas assiste-se a um sinal filogeográfico difuso em que apesar de se verificarem dois *clades* distintos, a presença de indivíduos geneticamente pertencentes a qualquer um deles é generalizada em quase todas as populações ibéricas (ver filogramas das figuras 21 e 22 e a rede haplotípica do Anexo XII, Fig. 37). Os indivíduos pertencentes ao *clade* 1 têm uma distribuição tendencialmente mais a sudoeste decrescendo a preponderância deste nas populações amostradas de Gibraltar para Burgos. As populações sublitorais do oeste da Península, Sierra Elvira e Caspe incluem-se exclusivamente no *clade* 2 que abarca também a maioria dos indivíduos da

metade norte da Península. Uma ressalva deve no entanto ser feita no que consta da frequência haplotípica uma vez que o esforço desigual de amostragem poderá estar a desvirtuar os resultados em populações mal amostradas como a da Andaluzia oriental onde apenas se teve acesso a duas amostras (ambas com o haplotipo H25) e a população do vale do Ebro (Caspé, Saragoça), apenas uma amostra (também com haplotipo H25). Em contraste, teve-se acesso a 20 indivíduos do Anticlinal de Estremoz, 13 da Serra da Adiça e 14 da Arrábida, o que faz pressupor que haplotipos presentes nestas populações em baixa frequência como H13, H27 ou H34 sejam de facto raros no fundo genético de *E. tagis* da Península Ibérica.

Neste aspecto a rede de haplotipos da figura 23 permite interpretar de forma mais detalhada as relações entre cada haplotipo. Os resultados indicam que no passado a população ibérica ancestral de *Euchloe tagis* se terá isolado em duas sub-populações e que estas posteriormente teriam sofrido diferenciação entrando mais recentemente em contacto através de migração interpopulacional. A adopção de um relógio molecular para a evolução deste fragmento do ADN mitocondrial permite estabelecer uma cronologia dos eventos filogeográficos. Segundo Brower (1994), a taxa de mutação para o COI encontra-se na ordem dos 2,3% /m. A., o que estabeleceria a separação entre o *clade bellezina* e o *clade 1* em aproximadamente 500 000-435 000 anos, em plena glaciação de Mindel (Elsteriano), no Pleistoceno médio (Bowen, 1978). Esta glaciação terá sido a mais intensa do Quaternário (Lindner *et al.*, 2003) e está associada a um “efeito gargalo” acentuado na espécie oeste mediterrânica *Cicada barbara* Stal. A diferenciação entre os *clades 1* e *2* teria ocorrido entre há aproximadamente 350 000 anos e 435 000 anos e é de supor que durante o mesmo episódio glacial mas a posição mais meridional da Península terá atrasado o processo. Dado que surge um padrão aparente de diferenciação dentro do *clade 2*, é de suspeitar que esta população se terá dividido em diferentes grupos durante um episódio glacial mais recente (Riss ou Würm) e a distância genética entre o haplotipo H20 e o H14 é de 0,2% o que pressupõe cerca de 87 000 anos de evolução independente. Mesmo tendo em conta a optimização da taxa de mutação de 2,3% por milhão de anos a insectos, é de referir que por uma questão de escala o cálculo dos tempos de divergência se reveste de um erro associado que é tendencialmente elevado porque além do mais depende de outros factores como o tempo de geração (Pulquério & Nichols, 2007).

Segundo esta interpretação, o padrão filogeográfico outrora teria sido bem estruturado mas actualmente apresenta-se difuso, o que coloca em evidência a

capacidade de dispersão desta espécie pelo menos até um passado recente. As suas populações terão sido sujeitas a sucessivos episódios de isolamento policêntrico em cada episódio glacial com também sucessivos eventos de intercâmbio de indivíduos. Esta tese de refúgios dentro do próprio refúgio que é a Península Ibérica encontra-se amplamente documentada em plantas (López-de-Heredia *et al.*, 2007), vertebrados (Paulo *et al.* 2002; Martinez-Solano *et al.* 2006; Centeno-Cuadros *et al.*, 2009), caracóis (Vialatte *et al.*, 2008) e mesmo borboletas (Vila *et al.*, 2005).

À luz deste fenómeno é possível explicar a grande diferenciação fenotípica entre *E. t. bellezina* (em que não existe sinal filogenético de um intercâmbio pós glaciações e terá permanecido restrita ao sul de França durante todo o ciclo glacial desde há 435000 anos) e a existência de haplotipos evolutivamente tão distantes nas mesmas populações ibéricas (como H7 do *clade* 1 e H18 do *clade* 2 na Serra da Adiça). De acordo com a teoria da coalescência, a grande dispersão de outros haplotipos, encontrados no interior da rede e portanto considerados ancestrais (caso de H5, em 3 populações; H25 e H21 em 4 populações) suporta esta ideia. O exemplo da Serra da Adiça representa ainda o efeito de uma dispersão leptocúrtica (Schwaegerle & Schael, 1979; Stone & Sunnucks, 1993; Beebe & Rowe, 1999) em que se terá dado uma colonização deste maciço calcário pelos dois *clades* independentemente tendo cada um dos haplotipos que lá chegou sofrido diferenciação no processo de expansão. No seguimento deste Maciço calcário e já em Espanha, *E. t. alhajarae* na Sierra de Alajar está mais próxima de todas as outras populações ibéricas e habita um maciço de maiores dimensões pelo que também apresenta não só maior variabilidade genética como esta área foi colonizada por indivíduos pertencendo à “secção setentrional” do *clade* 2.

A localização dos refúgios ao longo dos períodos glaciais do Quaternário torna-se difícil de avaliar à luz da complexidade da Península Ibérica e da falta de conhecimento sobre a manutenção de habitats de fácies mediterrânica ao longo dos períodos sub-óptimos. Contudo, é geralmente aceite que estes se terão restringido a bolsas nas orlas ocidental e meridional da Península (Schmitt, 2007) ou no vale do rio Ebro (Gonzalez-Samperiz *et al.*, 2005) e é em zonas como estas que se terão mantido e diferenciado espécies animais e vegetais que hoje se consideram relíquias do terciário (Pérez Latorre & Cabezudo, 2006; Jiménez-Moreno *et al.*, 2009). Contrariamente a inúmeros outros casos de espécies que podem variar a sua área de distribuição de acordo com as condições climáticas lhes serem favoráveis ou não, *E. tagis* está limitada pela geologia e presença das plantas alimentícias. As áreas de refúgio terão provavelmente



tido lugar nas manchas de calcários sob condições mediterrânicas da orla peninsular. Em virtude da diversidade observada, a faixa entre a Serra da Arrábida e o Maciço Calcário Estremenho seria uma boa candidata a zonas de refúgio ibérico numa primeira fase (todos os haplotipos destas Serras estão limitados ao *clade 2*, e nesta área existe um taxon endêmico do género *Iberis*, *I. procumbens microcarpa*), as serras do oeste da Extremadura, norte da Andaluzia e do Alentejo (possível local de diferenciação do *clade 1*). Mais tarde estes *clades* terão sofrido processos de diferenciação com os subsequentes períodos frios: o haplogrupo meridional do *clade 2* terá colonizado independentemente várias vezes as Serras ocupadas pelo *clade 1* e deu origem ao seu grupo meridional (a laranja na figura 23) bem como ao haplotipo H32 em Alajar. Mais recentemente a maioria destes grupos de populações terão colonizado a zona centro e norte da Península, outrora provavelmente não adequada para a subsistência da espécie, diferenciando-se, o que explica a grande diversidade haplotípica da população de Madrid ( $h=0,952$ ).

Seria esperada uma composição haplotípica diferente nas populações amostradas da Sierra Elvira (Granada, ES) e Caspe (Saragoça, ES) em virtude da sua distância ao *clade 2* mas a única informação que se pode tirar é que o haplotipo mais comum no *clade 2*, H25 chegou a esses locais. Em estudos futuros tornar-se ia fulcral a inclusão de mais amostras da cordilheira bética de Espanha em virtude de ser um importante centro de diferenciação comprovado ao nível da diversidade quanto ao número de endemismos em todos os grupos taxonómicos mas principalmente insectos e plantas (Blondel & Aronson, 1999; Cuttelod *et al.*, 2008), sob a óptica da diferenciação genética (*p. ex.* Paulo, 2001) e de um aumento na heterogeneidade fenotípica como ponto de diferenciação e origem de muitas populações ibéricas (Fernández-Rubio, 1990).

Durante este estudo não foi possível a obtenção de amostras de algumas populações mais periféricas como *E. t. calvensis* (Toscânia, Itália), *E. t. piemonti* (Piemonte, Itália), *E. t. aveyronensis* (Aveyron, França), *E. t. reisseri* (Rif, Marrocos), *E. t. atlasica* (Atlas, Marrocos) e *E. t. pechi* (Argélia). A inclusão destas populações mais marginais permitiria perceber melhor o sentido da colonização e a existência de mais refúgios glaciais *versus* a extrema diferenciação fenotípica de algumas formas, o estatuto de *E. tagis pechi* em relação às outras populações de *E. tagis* e o efeito do isolamento das populações marroquinas no seu fundo genético.

A análise hierárquica de variação molecular (AMOVA) coloca naturalmente a maior parte da variação molecular na divisão existente entre a população francesa e as

ibéricas ( $\phi_{CT}=0,50$ ) em virtude da não partilha de haplotipos entre as duas populações ao passo que os restantes arranjos se revestem de menor robustez. Associado está também um elevado valor de  $\phi_{ST}$  (0,68) o que implica um isolamento e diferenciação genética. No teste ao isolamento das populações do Maciço Calcário Estremenho em relação às restantes ibéricas (arranjo 2), o moderado valor de  $\phi_{ST}$  (0,56) implica que de facto existe um reduzido intercâmbio genético e o cenário repete-se para os outros agrupamentos. Dado que as populações do interior do Alentejo permanecem com um estatuto indefinido a nível morfológico (apesar das tendências enunciadas anteriormente), testou-se a colocação do Anticlinal de Estremoz como ponto de convergência e dispersão entre linhagens (arranjos 4-6) definidas morfológicamente. Os dados apontam para uma maior robustez na inclusão no grupo da subespécie castellana (Madrid + Burgos + Saragoça) ( $\phi_{CT} =0,45$ , arranjo 6) mas demonstrando maiores valores de distância genética se agrupado com a população de Alajar e Serra da Adiça (ssp. *alhajarae*).

A grande diversidade haplotípica detectada na espécie *E. tagis*, a grande diferenciação entre três linhagens distintas e a estruturação populacional moderada independentemente do agrupamento escolhido sugerem que estamos perante uma espécie que, apesar dos eventos glaciais do Pleistoceno, terá sobrevivido em múltiplos refúgios ibéricos durante os períodos de maior alteração climática do Quaternário, tendo respondido nos períodos inter-glaciais com uma grande capacidade de colonização de novas áreas. Contudo, a estruturação populacional actual é incongruente com a classificação taxonómica o que leva a crer que a diferenciação morfológica terá tido lugar após a definição das linhagens mitocondriais ou ter uma forte componente ambiental. Um caso semelhante descrito na literatura diz respeito à espécie de borboleta holártica *Coenonympha tullia*, com duas subespécies morfológicas no Reino Unido (Joyce *et al.*, 2009) mas cuja análise genética chega à conclusão que há duas linhagens distintas não concordantes com os dados morfológicos. Ao invés, a estruturação encontrada seria resultante de duas colonizações independentes do Reino Unido a partir de um único refúgio glacial, tendo as sequências divergentes cerca de 400 000 anos de isolamento entre elas, o que vem realçar a importância da necessidade do uso de marcadores moleculares na obtenção de uma hipótese filogenética não mascarada pela adaptação fenotípica local.

A homogeneidade morfológica e ecológica na maioria das populações de *E. tagis* leva-nos a descartar a ideia de se estar perante a existência de espécies crípticas

em virtude da grande distância genética entre haplotipos na mesma população (*sensu* Herbert *et al.*, 2004). Dado que o ADN mitocondrial não se recombina ou as suas linhagens não interagem directamente quando em contacto, não nos fornece informação sobre o grau de hibridação entre linhagens que possam ter evoluído separadamente aquando dos eventos vicariantes e tal apenas poderia ser respondido através da utilização de marcadores nucleares (Avice, 2000). Existindo actualmente uma bateria de genes cujo estudo se encontra optimizado para Lepidoptera (Wahlberg & Wheat, 2008), a sua utilização em estudos futuros poderá contribuir para o esclarecimento desta questão. De relevante uso na resolução taxonómica seria também a optimização dos estudos comparativos recorrendo a caracteres morfológicos com possível valor adaptativo, como o padrão e configuração alar, através de métodos comprovadamente úteis e objectivos com reconhecida robustez como a morfometria geométrica (Mutanen & Pretorius, 2007).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Branca-Portuguesa, *Euchloe tagis* é uma espécie oeste-mediterrânica descoberta em Portugal há mais de 200 anos, mas onde se manteve quase desconhecida até ao presente estudo. Sabe-se actualmente que está dispersa em populações isoladas que incluem a Serra dos Candeeiros, Serra da Arrábida e São Luís, Serra da Adiça e Anticlinal de Estremoz. A sua distribuição está estreitamente correlacionada com a presença de calcários, matagal mediterrânico bem desenvolvido e das plantas alimentícias, crucíferas no género *Iberis*. Apesar de existirem poucos habitats disponíveis em Portugal, é provável a detecção de novas populações em virtude da deficiente cartografia das plantas e de um incompleto conhecimento lepidopterológico. Com este estudo lançam-se as bases para a compreensão dos requisitos ecológicos da espécie, fundamentais para a detecção de novas populações e para a sua conservação.

Contudo, entre os dados mais significativos está a grande diversidade genética das populações ibéricas e a aparente inconcordância entre o padrão de diferenciação ao nível do gene mitocondrial COI na Península Ibérica e a classificação taxonómica actual, pelo que será essencial aprofundar a investigação segundo novas linhas de evidência. Um complemento viável será a utilização de marcadores moleculares com taxas de evolução diferentes do gene utilizado no presente estudo, nomeadamente os genes nucleares, e ainda proporcionar uma sinergia entre a análise genética e métodos de análise biométrica como a morfometria geométrica. A nível filogeográfico, os dados sugerem uma disjunção inicial das populações ibéricas e francesas em dois refúgios glaciais no Pleistoceno e manutenção de características climáticas adequadas para a sobrevivência de populações policêntricas peninsulares. Os sucessivos episódios de isolamento e ulterior migração geraram a estruturação populacional actual.

Embora a área de ocorrência conhecida da espécie em Portugal seja agora muito superior à previamente estabelecida, os habitats de *E. tagis* reúnem uma elevada biodiversidade e estão sujeitos a diversos factores de ameaça. Esta espécie reúne as condições de espécie indicadora de diversidade ecológica cuja conservação irá proporcionar a manutenção de todo um ecossistema característico (“espécie guarda-chuva”). A exploração do conceito de “espécie bandeira”, a par de outras espécies ameaçadas dará mais peso à conservação dos seus habitats no âmbito das políticas europeias de ordenamento do território e no contexto da travagem da perda de biodiversidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERY, P. R., JONG, R. DE & VANE-WRIGHT, R. I. 1999. The Butterflies: Hedyloidea, Hesperioidea and Papilionoidea. *in*: Lepidoptera: Moths and Butterflies. 1. Evolution, Systematics, and Biogeography. *Handbook of Zoology* Vol. IV, Part 35. N. P. Kristensen, ed. De Gruyter, Berlin and New York.
- AGUIAR, C. 2002. Flora e Vegetação da Serra de Nogueira e do Parque Natural de Montesinho. *Dissert. Dout. Eng. Agron. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.* 661 pp.
- AIZPÚRUA de, C. G. 1988. *Biología y morfología de las orugas (Lepidoptera). Tomo 5, Danaidae – Papilionidae – Pieridae – Libytheidae – Nymphalidae.* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- AKIN, W. E. 1991. *Global Patterns: Climate, Vegetation, and Soils.* University of Oklahoma Press. 370 pp.
- ALMEIDA, F. M., CARVALHO, D., & MONTEIRO, J. H. 1979. *Introduction à la Géologie Général du Portugal.* Serv. Geol. Portugal, Lisboa, 121 pp.
- ALMEIDA, J. D. 2001. Adiciones corológicas a *Flora Iberica* IV: Cruciferae (38 provincias portuguesas no referenciadas). *Stud. Bot.* **20**: 163-166.
- ANDERSON, S. J., CONRAD, K. F., GILLMAN, M. P., WOIWOD, I. P. & FREELAND, J. R. 2008. Phenotypic changes and reduced genetic diversity have accompanied the rapid decline of the garden tiger moth (*Arctia caja*) in the U.K. *Ecological Entomology*, **33**(5): 638–645.
- ATTENBOROUGH, D. 2001. Foreword. *In The millennium atlas of butterflies in Britain and Ireland.* Oxford University Press.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species.* Harvard University Press: Cambridge, MA.
- AVISE, J. C., ARNOLD, R. M., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* **18**: 489-522.
- BACK, W., KNEBELSBERGER, T. & MILLER, M. A. 2006. The phylogenetic relationships of the species and subspecies of the subgenus *Elphinstonia* KLOTS, 1930. *Atalanta* **37**(3/4): 469-482.

- BACK, W., KNEBELSBERGER, T. & MILLER, M. A. 2008 Molekularbiologisch Untersuchungen und Systematik der palaearktischen Arten von *Euchloe* Hübner, [1819] (Lepidoptera, Pieridae). *Entomologische Zeitschrift* **118**: 151-169.
- BALLETO, E. & CASALE, A. 1991. Mediterranean insect conservation. In *The Conservation of Insects and their Habitats* (N.M. Collins and J.A. Thomas, eds.) pp. 121–42. London: Academic Press.
- BALLARD, J. W. O. & RAND, D. M. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu Rev Ecol Syst* **36**: 621-642.
- BALLARD, J. W. O. & WHITLOCK, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* **13**: 729-744.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., SYKES, B. C., RICHARDS, M. B. 1995. Mitochondrial portraits of human population using median networks. *Genetics*. **141**: 743-753.
- BATES, B. C., KUNDZEWICZ, Z. W., WU, S. & PALUTIKOF, J. P. (eds.). 2008. *Climate Change and Water*. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC Secretariat, Geneva. 210 pp.
- BEEBEE, T. J. C. & ROWE, G. 1999. Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biol J Linn Soc.* **69**: 367–381.
- BELLA, J. L., SERRANO, L., ORELLANA, J. & MASON, P. L. 2006. The origin of the *Chortippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *J. Evol. Biol.* **20**: 568–576.
- BELTRÁN, M., JIGGINS, C., BULL, V., LINARES, M., MALLET, J., MCMILLAN, W. O. & BERMINGHAM, E. 2002. Phylogenetic discordance at the species boundary: comparative gene genealogies among rapidly radiating *Heliconius* butterflies. *Molecular Biology and Evolution*. **19**: 2176-2190.
- BLONDEL, J. & ARONSON, J. 1999. *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford: Oxford University Press.
- BERNARDI, G., 1945. Études sur le genre *Euchloe* Hb. *Miscellanea entom.* **42**(6): 65-104.
- BRABY, M. F. & TRUEMAN, J. W. H. 2006. Evolution of larval host plant associations and adaptive radiation in pierid butterflies. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1667-1690.

- BRABY, M. F., VILA, R. & PIERCE, N. E. 2006. Molecular phylogeny and systematics of the Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea): higher classification and biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*. **147**: 239-275.
- BRANCO, M., MONNEROT, M., FERRAND, N., TEMPLETON, A.R. 2002. Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from nested *clade* and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. *Evolution* 56, 792–803.
- BRAUN-BLANQUET, J., SILVA, A. R. PINTO DA & ROSEIRA, A. 1958. Résultats de deux excursions géobotaniques à travers de Portugal septentrional et moyen. II. Chenaies à feuilles caduques et chenaies à feuilles persistents. *Agronomia Lusitana*. **18**: 167-245.
- BRAUN-BLANQUET, J., SILVA, A. R. Pinto da & ROSEIRA, A. 1964. Résultats de trois excursions géobotaniques à travers le Portugal septentrional et moyen. III. Landes À cistes et ericacées (*Cisto-Lavanduletea et Calluno-Ulicetea*). *Agronomia Lusitana*. **23**(4): 229-313.
- BROWER, A. V. Z. 1994. Phylogeny of Heliconius butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae) *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**: 159-174.
- CABALLERO, V. E. 1996. Biología y ecología del género *Euchloe* (Lepidoptera: Pieridae) en el sur de la Península Ibérica. *Unpublished Ph. D. Thesis*. Universidad de Córdoba.
- CARRIÓN, J. S., FINLAYSON, C., FERNÁNDEZ, S., FINLAYSON, G., ALLUÉ, E., LÓPEZ-SÁEZ, J. A., LÓPEZ-GARCÍA, P., GIL-ROMERA, G., BAILEY, G. & GONZÁLEZ-SAMPÉRIZ, P. 2008. A coastal reservoir of biodiversity for Upper Pleistocene human populations: palaeoecological investigations in Gorham's Cave (Gibraltar) in the context of the Iberian Peninsula. *Quaternary Science Reviews*. **27**: 2118-2135.
- CASINI, P. M. 1993. Première station pour l'Italie péninsulaire d'*Euchloe tagis* Hübner (1804) et description de la *ssp. nov. calvensis* (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica* **14**(1): 3-13.
- CASINI, P. M. 1996. Deux nouvelles stations d'*Euchloe tagis* (Hübner, 1804) en Italie centrale. Élevage d'*Euchloe tagis calvensis* Casini (1993), *Euchloe ausonia* (Hübner, 1804) et *Anthocharis cardamines* (Linnaeus, 1758) au Mont Calvi

- (Livorno, Italie centrale) (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica*. **15**(7): 275-280.
- CASINI, P. M. 2001. Les premiers états d'*Euchloe tagis calvensis* (Casini, 1993). Carte de répartition d'*Euchloe tagis* (Hübner, 1804) en Italie centrale. Considérations géologiques et zoogéographiques (Lepidoptera: Pieridae). *Linn. Belgica*. **18**: 75-86.
- CATARINO, F. M., CORREIA, O. C. A. & CORREIA, A. I. V. D. 1982. Structure and Dynamics of Serra da Arrábida Mediterranean vegetation. *Ecologia Mediterranea*. **8**: 203-222.
- CATRY, F. X., REGO, F. C., MOREIRA, F. & BACAO, F. 2008. Characterizing and modelling the spatial patterns of wildfire ignitions in Portugal: fire initiation and resulting burned area. In Heras, J., Brebbia, C. A., Viegas, D. & Leone, V. *Modelling, Monitoring and Management of Forest Fires I*, 432 pp.
- CBD Secretariat. 2002. *Strategic Plan for the Convention on Biological Diversity*. Publication of the Decision VI/26. Sixth meeting of the Convention on Biological Diversity 2002.
- CEC. 2001 A Sustainable Europe for a Better World: A European Union Strategy for Sustainable Development. COM(2001) 264 final. Brussels. Commission of the European Communities. Online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2001:0264:FIN:EN:PDF>
- CEC. 2006. Halting the loss of biodiversity by 2010 and beyond, sustaining ecosystem services for human wellbeing. COM(2006)216 final. Brussels, Commission of the European Communities. Online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0216:FIN:PT:PDF>
- CENTENO-CUADROS, A., DELIBES, M. & GODOY, J. A. 2009. Phylogeography of Southern Water Vole (*Arvicola sapidus*): evidence for refugia within the Iberian glacial refugium. *Mol. Ecol.* **18**(17): 3652-3667.
- CLEMENTE, A. S., REGO, F. C. & CORREIA, O. A. 1996. Demographic Patterns and Productivity of post-fire regeneration in portuguese mediterranean maquis. *International Journal of Wildland Fire*. **6**(1): 5-12.
- COOPER, S. J. B., IBRAHIM, K. M., HEWITT, G. M., 1995. Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **4**: 49-60.



- CORLEY, M. F. V., GARDINER, A. J., CLEERE, N. & WALLIS, P. D. 2000. Further additions to the Lepidoptera of Algarve, Portugal (Insecta: Lepidoptera).— *SHILAP Revta. lepid.* **28**(111): 245-319.
- CORLEY M. F. V., MARABUTO, E., MARAVALHAS, E., PIRES, P. & CARDOSO, J. P. 2008. New and interesting Portuguese Lepidoptera records from 2007 (Insecta: Lepidoptera). *Shilap-Revta lepid.* **140**(36): 283-300.
- CORLEY, M. F. V., MARABUTO, E. & PIRES, P. 2007. New Lepidoptera for the fauna of Portugal (Insecta: Lepidoptera). *SHILAP Revta. lepid.* **139**(35): 321-334.
- CORREIA, O. C. A. 1988. Contribuição da fenologia e da ecofisiologia em estudos da sucessão e dinâmica da vegetação mediterrânica. *Tese de doutoramento*. 196 pp.
- COURTNEY, S. P. & CHEW, F. S. 1987. Coexistence and host use by a large community of Pierid butterflies: habitat is the templet. *Oecologia.* **71**: 210-220.
- CRANDALL, K. A., BININDA-EDMONDS, O. R. P., MACE, G. M., & WAYNE, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology: an alternative to ‘evolutionary significant units’. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 290-295.
- CUTTELOD, A., GARCÍA, N., MALAK, D. A., TEMPLE, H. J., & KATARIYA, V. 2008. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. In VIÉ, J.-C., HILTON-TAYLOR, C. & STUART, S. N. (eds.). 2009. *Wildlife in a Changing World – An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland, Switzerland: IUCN. 180 pp.
- DAYAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc.* **85**(3): 407–415.
- DE-GREGORIO, J. J. P., REDONDO, V. M. & RONDÓS i CASES, M. 1992. *Elphinstonia charlonia* (Donzel, 1842), género y especie nuevos para la fauna ibérica (Lepidoptera, Pieridae). *ZAPATERI Revta. aragon. ent.* **1**(2): 13-16.
- DENNIS, R. L. H., HODGSON, J. G., GRENYER, R., SHREEVE, T. G. & ROY, D. B. 2004. Host plants and butterfly biology. Do host-plant strategies drive butterfly status? *Ecological Entomology.* **29**: 12-26.
- DENNIS, R. L. H., WILLIAMS, W. R. & SHREEVE, T.G. 1991. A multivariate approach to the determination of faunal structures among European butterfly species (Lepidoptera: Rhopalocera). *Zoological Journal of the Linnean Society* **101**: 1-49.
- DEVARENNE, M. 1990. Dix ans de prospections entomologiques à travers l’Afrique du Nord (Lep. Rhopalocera), *Alexanor.* **16**(3): 143.

- DUFRENE, M. & LEGENDRE, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*. **67**: 345-366.
- EEA, 2007. Halting the loss of biodiversity by 2010: proposal for a first set of indicators to monitor progress in Europe. *EEA Technical report n° 11*. EEA, Copenhagen.
- ESPIRITO SANTO, M. D. & LOUSA, M. 1981. *A Flora do Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros*, C.B.A.A.U.T.L., Lisboa.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. **1**: 47-50.
- FELSENSTEIN, J. 1978. Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**: 401-410.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences – a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. **17**: 368-376.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, F. 1990. *Guía de Mariposas diurnas de la Península Ibérica. Zygenas*. Piramide. 168 pp.
- FORD, T. H., SHAW, M. R. & ROBERTSON, D. M. 2000. Further host records of some western palaeartic Tachinidae (Diptera). *Entomol. Rec. J. Var.* **112**: 25-36.
- FRANCO, J. A. 1971. *Nova flora de Portugal. Volume 1. Lycopodiaceae – Umbeliferae*.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 617 pp.
- GALLO, E. 1978. Alcune interessanti catture di Lepidotteri in Italia. *Bollettino Società Entomologica Italiana*. Genova, **110**: 84-86.
- GARCÍA-BARROS, E., MUNGUIRA, M. L., MARTÍN CANO, J., ROMO BENITO, H., GARCIA PEREIRA, P. & MARAVALHAS. E. S. 2004. Atlas de las mariposas diurnas de la Península Ibérica e islas Baleares (Lepidoptera: Papilionoidea & Hesperioidea). *Monografías S.E.A.* **11**. 228 pp.
- GARCÍA-VILLANUEVA, V., BLÁZQUEZ CASELLES, a., NOVOA PÉREZ, J. M. & NIETO MANZANO, M. A. 1997. *Atlas de los lepidópteros ropalóceros de*

- extremadura (Hesperioidea & Papilionoidea)*. 122 pp. Instituto Extremeño de Entomología. Badajoz.
- GASCUEL, O. & STEEL, M. 2006. Neighbor-joining revealed. *Mol Biol Evol* **23** (11): 1997-2000.
- GONÇALVES, F. & COELHO, A. P. 1974. *Notícia explicativa da folha 36-B. Estremoz*. Serviços geológicos de Portugal. 64 pp.
- GONZALEZ-SAMPERIZ, P., VALERO-GARCES, B. L., CARRION, J. S., PENAMONNE, J. L., GARCIA-RUIZ, J. M., & MARTI-BONO, C. 2005. Glacial and lateglacial vegetation in northeastern Spain: New data and a review *Quaternary International*. **140-141**: 4-20.
- GODINHO, R., PAULO, O. S., FERRAND, N., LUÍS, C., ROSA, H. D. & CRESPO, E. G. 2003. Major patterns of population differentiation in the Iberian Schreiber's Green lizard (*Lacerta schreiberi*) inferred from protein polymorphism. *The Herpetological Journal*. **13**: 35-42.
- GÓMEZ, A. & LUNT D. H. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogenetic concordance in the Iberian Peninsula. In Weiss, S. & Ferrand, N. (eds.): *Phylogeography of Southern Europe Refugia*. Springer, London.
- GRIMALDI, D. & ENGEL, M. S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. 755 pp.
- HAJIBABAEI, M., deWAARD J., IVANOVA, N., RATNASINGHAM, S., DOOH, R., KIRK, S. *et al.* 2005a. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. 1959-1967.
- HAJIBABAEI, M., JANZEN, D. H., BURNS, J. M., HALLWACHS, W. & HERBERT, P. D. N. 2005b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 968-971.
- HERBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L. & deWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **270**: 313-321.
- HERBERT, P. D. N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D. H., HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 14812–14817.

- HEWITT, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**: 247-276.
- HEWITT, G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* **68**: 87-112.
- HEWITT, G. M. 2004. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Front Zool.* **1**:4.
- HEY, J. 1994. Bridging phylogenetics and population genetics with gene tree models. In *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner & R. DeSalle (eds.). Basel: Birkhäuser Verlag. pp. 435-449.
- HOLSINGER, K. E. & WEIR, B. S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F<sub>st</sub>*. *Nature Review Genetics.* **10**: 639-650.
- HIGGINS, L. G. & RILEY, N. D. 1983. *Butterflies of Britain & Europe*. Fifth edition. HarperCollins Publishers, London. 384 pp.
- HUERTAS DIONISIO, M. 1986. Estados inmaturos de Lepidoptera (II) Género *Euchloe* Hübner, [1823] (Pieridae: Anthocharinae). *Shilap Revta. Lepid.* 14(56): 17-26.
- HUNDSDOERFER, A.K., KITCHING, I. J. & WINK M. 2005. The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): Molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints.” *Organisms, Diversity & Evolution*, **5**: 173-198.
- ICN, 2006. *Plano Sectorial Rede Natura 2000. Volume 1*. Instituto da Conservação da Natureza. 133 pp.
- JIMÉNEZ-MORENO, G., FAUQUETTE, S. & SUC, J-P. 2009. Review of Palaeobotany and Palynology (2009). *In press*. Disponível online.
- JOYCE, D. A., DENNIS, R.L. H., BRYANT, S. R., SHREEVE, T. G., READY, J. S. & PULLIN, A. S. 2009. Do taxonomic divisions reflect genetic differentiation? A comparison of morphological and genetic data in *Coenonympha tullia* (Müller), Satyrinae. *Biol. J. Linn. Soc.* **97**: 314-327.
- JUTZELER, D. 1993. Elevage d'*Euchloe tagis* ssp. *bellezina* (Boisduval 1828) du Piémont (Italie du Nord-Ouest) (Lepidoptera: Pieridae). *Bulletin de la Société entomologique de Mulhouse.* **49**: 45-48.

- JUTZELER, D., RUSSO, L. & BROS, E. 1996. Écologie et premiers états d'*Euchloe insularis* (Staudinger, 1861) dès Monti del Gennargentu (Sardaigne) (*Lepidoptera: Pieridae*). *Linneana Belgica* **XV(5)**: 214-218.
- KUDRNA, O. 1983. An Annotated catalogue of the butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea) named by Roger Verity. *Journal of Research on the Lepidoptera*. **21(1)**: 1-106.
- KUDRNA, O. 1986. Butterflies in Europe. Volume 8: Aspects of the Conservation of Butterflies in Europe. Aula-Verlag. Wiesbaden.
- KUDRNA, O. 2002. *The Distribution Atlas of European Butterflies*. *Oedippus*. **20**: 1-343.
- LAFRANCHIS, T. 2000. *Les papillons de jour de France, Belgique et Luxembourg et leurs chenilles*. 448 pp. Parthenope. Mèze.
- LEAKEY, L. & LEWIN, L. 1995. *The Sixth Extinction: Biodiversity and its Survival*. Phoenix, London.
- LINDNER, L., DZIERZEK, J., MARCINIAK, B. & NITYCHORUK, J. 2003. Outline of Quaternary glaciations in the Tatra Mts.: their development, age and limits. *Geological Quarterly* **47**: 269–280.
- LOPES, M. C. 2001. A flora e vegetação das terras de Sicó. Dissertação de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- LÓPEZ-DE-HEREDIA, U., CARRIÓN, J. S., JIMÉNEZ, P., COLLADA, C., GIL, L., 2007. Molecular and palaeoecological evidence for multiple glacial refugia for evergreen oaks in the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography* **34**: 1505–1517.
- MANGERUD, J., EHLERS, J. & GIBBARD, P. 2004. *Quaternary Glaciations: Extent and Chronology 1: Part I Europe*. Elsevier, Amsterdam.
- MANUPPELLA, G. & BALACÓ MOREIRA, J. C. 1975. Panorama dos Calcários Jurássicos Portugueses. *Comunicação apresentada ao II Congresso Ibero-Americano de Geologia Económica*. Buenos Aires. Argentina. Versão Online: [http://e-Geo.ineti.pt/geociencias/edicoes\\_online/diversos/artigos/calcarios\\_jurassico.htm](http://e-Geo.ineti.pt/geociencias/edicoes_online/diversos/artigos/calcarios_jurassico.htm)
- MANUPPELLA, G., Balacó Moreira, J. C. & ROMÃO, M. L. 1981. Panorama dos Dolomitos e Calcários Dolomíticos Portugueses. *Boletim de Minas do Instituto Geológico e Mineiro* Separata do Vol. 17, Nº 4. Versão Online: [http://e-Geo.ineti.pt/geociencias/edicoes\\_online/diversos/artigos/dolomitos.htm](http://e-Geo.ineti.pt/geociencias/edicoes_online/diversos/artigos/dolomitos.htm)

- MARABUTO, E. M., 2003. *Lemonia philopalus*, a new species for the fauna of Portugal (Lepidoptera, Lemoniidae). *Bol. SEA* **33**: 101-103.
- MARABUTO, E. & MARAVALHAS, E. 2008. Contribution to the knowledge of the Lepidoptera of the Natura 2000 site "Montesinho- Nogueira", Trás-os-Montes, Portugal (Insecta, Lepidoptera). *Bol. SEA*. **43**: 145-151.
- MARABUTO, E., PIRES, P. & CARDOSO, J. P., 2004. Contribution to the knowledge of the Macrolepidoptera of Parque Natural da Serra da Estrela, Portugal (Lepidoptera). *Bol. SEA* **34**: 171-175.
- MARAVALHAS, E. 1999. Estatuto de conservação das borboletas (Lepidoptera, Rhopalocera) de Portugal. Supl. 6 Bol. SPEN: 523-533.
- MARAVALHAS, E. *et al.* 2003. *As Borboletas de Portugal*. Edições Vento Norte, 464 pp.
- MARTÍNEZ-SOLANO, I., TEIXEIRA, J., BUCKLEY, D. & GARCÍA-PARÍS, M. 2006. Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Mol Ecol.* **15**(11): 3375-88.
- MAWDSLEY, N. A. & STORK, N. E. 1995. Species extinctions in insects: ecological and biogeographical considerations. In *Insects in a Changing Environment*, ed. Harrington, R. & Stork, N.E. pp. 321-369. London, Academic.
- MCGEOCH, M. A. 1998. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. *Biological Reviews*. **73**: 181-201.
- MCGEOCH, M. A. van RENSBURG, B. J. & BOTES, A. 2002. The verification and application of bioindicators: a case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology*. **39**: 661-672.
- MENDES, C. A. 1910. Lepidopteros de Portugal. II. Lepidopteros de Val de Rosal (Caparica de Monte) em 12 e 13 de Abril. *Brotéria, Série zoológica, Lisboa*. **9**: 129-132.
- MIKKOLA, K. 2008. The lock-and-key mechanisms of the internal genitalia of the Noctuidae (Lepidoptera): How are they selected for? *Eur. J. Entomol.* **105**: 13-25.
- MORENO, M. 1997. *Iberis* in Castroviejo, S. (coor.), *Flora Ibérica* Vol. IV: 271-293. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- MORITZ, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*. **51**(2): 238-254.

- MUTANEN, M. & PRETORIUS, E. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*. **32**: 371-386.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., da FONSECA, G. A. B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.
- NEW, T. R. 1997a. Are Lepidoptera an effective ‘umbrella group’ for biodiversity conservation? *Journal of Insect Conservation*. **1**: 5-12.
- NEW, T. R. 1997b. *Butterfly Conservation*. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press. 248 pp.
- NIJHOUT, H. F., 1991. *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns*, Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- OLIVARES, J. O. V., BACK, W. 2004. *Euchloe tagis* (Hübner, [1804]) (Lepidoptera, Pieridae) en Andalousie et description d’une sous-espèce nouvelle. *Linneana Belgica*. **19**(5): 229-240.
- OPLER, P. A. 1966a. Studies on the Nearctic *Euchloe*. Part 1. Introduction. *Jour. Res. Lepid.* **5**: 39-40.
- OPLER, P. A. 1966b. Studies on the Nearctic *Euchloe*. Part 2. Chronological review of the literature and bibliography. *Jour. Res. Lepid.* **5**: 41-50.
- OPLER, P. A. 1970. Studies on the Nearctic *Euchloe*. Part 5. Distribution. *Jour. Res. Lepid.* **7**: 65-86.
- OPLER, P. A. 1974. Studies on the Nearctic *Euchloe*. Part 7. Comparative life histories, hosts and the morphology of immature stages. *Jour. Res. Lepid.* **13**: 1-20.
- PALUMBI, S. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular systematics, second edition* (eds. Hillis D, Moritz C, Mable B). pp. 205-247. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.
- PAULO, O. S. 2001. The phylogeography of reptiles of the Iberian Peninsula. PhD, University of London.
- PAULO, O. S., JORDAN, W. C., BRUFORD, M. W., NICHOLS, R. A. 2002. Using nested *clade* analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian lizard. *Molecular Ecology*. **11**: 809-819.
- PÉREZ LATORRE, A. V. & CABEZUDO, B. 2006. Phenomorphology and Eco-morphological characters of *Rhododendron* Lauroid Forests in the Western Mediterranean (Iberian Peninsula, Spain). *Plant Ecology*. **187**(2): 227-247.

- PEREIRA-COUTINHO, A. X. 1913. *Flora de Portugal (Plantas vasculares)*. Ed. 1. Paris, Lisboa, Rio de Janeiro, S. Paulo & Belo Horizonte.
- PINA MARTINS, F. & PAULO, O. S. 2008. CONCATENATOR: data matrices handling made easy. *Molecular Ecology Resources*. 1254-1255.
- PINTO GOMES, C. J. 1995. A Serra de Ficalho, Flora e Vegetação. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Direcção regional do ambiente e recursos naturais do Alentejo. 153 pp.
- PINTO GOMES, C. & FERREIRA, R. J. P. P. 2005. Flora e Vegetação do Barrocal Algarvio (Tavira – Portimão). Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve. 354 pp.
- PINTO-JUMA, G. A., QUARTAU, J. A. & BRUFORD, M. W. 2008. Population structure of *Cicada barbara* Stal (Hemiptera, Cicadoidea) from the Iberian Peninsula and Morocco based on mitochondrial DNA analysis. *Bulletin of Entomological Research*. **98**: 15-25.
- POLLARD, E. & YATES, T. J. 1993. Monitoring butterflies for ecology and conservation. *Chapman & Hall*. 274 pp.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **14**: 817-818.
- PULQUÉRIO, M. J. F. & NICHOLS, R. A. 2007. Dates from the molecular clock: How wrong can we be? *Trends in Ecology and Evolution*. **22**(4): 180-184.
- PYLE, R. M. 1992. *Handbook for butterfly watchers*. Boston, Houghton Mifflin.
- RANNALA, B. & YANG, Z. 2003. Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, **164**: 1645–1656.
- REISSINGER, E. 1989. Checkliste Pieridae Duponchel, 1835 (Lepidoptera) der Westpalaearktis (Europa, NordwestafrikaKaukasus, Kleinasien). *Atalanta, Würzburg*, **20**(1/4): 149-185.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. **19**: 1572-1574.
- RUBINOFF, D., CAMERON, S: & WILL, K. 2006. A Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. *Journal of Heredity*. **97**(6): 581-594.
- SAMWAYS, M. J. 1994. *Insect Conservation Biology*. London. Chapman & Hall.



- SANTOS-REIS, M. 2003. De novo no rasto do lince-ibérico. Disponível em <http://www.naturlink.sapo.pt>. Consultado em 10-IX-2009.
- SAVELA, M. (coord.) 2009. *Euchloe*, parte do website. Disponível em: [www.nic.funet.fi/index/Tree\\_of\\_life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/pieridae/pierinae/euchloe/index.html](http://www.nic.funet.fi/index/Tree_of_life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/pieridae/pierinae/euchloe/index.html). Consultado em 20-I-2009.
- SCHWAEGERLE, K. E. & SCHAAL, B. A. 1979. Genetic variability and founder effect in the pitcher plant *Sarracenia purpurea*. *Evolution*. **33**: 1210–1218.
- SETTELE, J., KUDRNA, O., HARPKE, A., KÜHN, I., Van SWAAY, C., VEROVNIK, R., WARREN, M., WIEMERS, M., HANSPACH, J., HICKLER, T., KÜHN, E., Van HALDER, I., VELING, K., VLIEGENTHART, A., WYNHOFF, I., SCHWEIGER, O. 2008. *Climatic Risk Atlas of European Butterflies*. Pensoft, Sofia, Moscow. *BioRisk* **1** (Special Issue): 1-710.
- SIDDAL, M. & WHITING, M. 1999. Long-branch abstraction. *Cladistics*. **15**: 9-24.
- SILVA, A. R. Pinto da. 1991. A flora da Serra de Sintra. 257 pp.
- SILVA, A. R. Pinto da & FRANCO, J. A. 1993. Iberis L. In: Tutin TG, Heywood VH, Walters SM & Webb DA, (ed. 2). *Flora Europaea* (ed 2). Vol. 1, 390-393. Cambridge: Cambridge University Press.
- SILVA, J. M. & CAMARINHAS, M. V. F. 1960. Calcários cristalinos de Vila Viçosa-Sousel. "Estudos, Notas e Trabalhos do S. F. M. ", **XIV** (1-2), Porto.
- SILVA-BRANDÃO, K. L., LYRA, M. L. & FREITAS, A. V. Barcoding Lepidoptera: Current Situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical Entomology*. **38**(4): 441-451.
- SCOTT, J. 1968. Hilltopping as a mating mechanism to aid the survival of low density species. *Journal of Research on the Lepidoptera*. **7**(4): 191-204.
- SCHMITT, T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and Postglacial trends. *Front. Zool.* **4**: 11.
- SCHROEDER, F. C., DEL CAMPO, M. L., GRANT, J. B., WELBEL, D. B., SMEDLEY, S., BOLTON, K. L., MELNWALD, J. & ELSNER, T. 2006. Pinoresinol: A lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(42): 15497-15501.
- SIMON C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences

- and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers *Ann. Entomol. Soc. Am* 87:651-701.
- SMEDLEY, S., SCHROEDER, F. C., WEIBEL, D. B., MEINWALD, J., LAFLEUR, K. A., RUTOWSKI, R. & ELSNER, T. 2002. Mayolenes: Labile defensive lipids from the hairs of a caterpillar (*Pieris rapae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**(10): 6822-6827.
- SOULÉ, M. E. 1985. What is Conservation Biology? *Bioscience*. **35**: 727-734.
- STRAUSS, R. E. 1990. Patterns of quantitative variation in lepidopteran wing morphology: the convergent groups Heliconiinae and Ithomiinae (Papilionoidea: Nymphalidae). *Evolution*, **44**(1): 86-103.
- STONE, G. N. & SUNNUCKS, P. 1993. Genetic consequences of an invasion through a patchy environment – the cynipid gallwasp *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Mol Ecol*. **2**: 251–268.
- SUNDERMANN, H. 1980. *Europäische und Mediterrane Orchideen*. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- SWOFFORD, D., OLSEN, G., WADDELL, P. & HILLIS, D. 1996. Phylogenetic Inference. In: *Molecular systematics, second edition* (eds. Hillis D, Moritz C, Mable B). pp. 407-514. *Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA*
- TARRIER, M. & DELACRE, J. 2008 *Les Papillons de jour du Maroc. Guide d'identification et de bioindication*. Collection Parthénope, Editions Biotope, Mèze, 400 pp.
- TAKHTAJAN, A. (1986). *Floristic regions of the world*. Xxii. Berkeley, Los Angeles & London. 522 pp.
- TEMPLETON, A. R. 1998. Nested *clade* analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381–397.
- TEMPLETON, A. R., ROUTMAN, E. & PHILLIPS, C. A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**: 767–782.
- TENNENT, J. 1996. *The Butterflies of Morocco, Algeria and Tunisia*. 217 pp.
- THOMAS, J. A., TELFER, M. G., ROY, D. B., PRESTON, C. D., GREENWOOD, J. J. D., ASHER, J., FOX, R., CLARKE, R. T. & LAWTON, J. H. 2004.

- Comparative losses of British butterflies, birds and plants and the global extinction crisis. *Science* **303**: 1879-1881.
- THOMAS, J. A. 2005. Monitoring change in the abundance and distribution of insects using butterflies and other indicator groups. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **360**: 339-357.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25** (24): 4876-4882.
- TOLMAN, T. & LEWINGTON, R. 1997. *Collins Field Guide to Butterflies of Britain & Europe*. HarperCollins Publishers, London. 320 pp.
- TYTECA, D. 1998. The Orchid Flora of Portugal. *Journal Europäischer Orchideen*. **29**(2/3). 581 pp.
- USHER, M. B. (ed.). 1986. *Wildlife conservation evaluation*. London, Chapman & Hall.
- Van SWAAY, C. A. M. & WARREN, M. S. 1999. *Red Data book of European butterflies. (Rhopalocera)*. Nature and Environment, No. 99, Council of Europe Publishing.
- Van SWAAY, C., WARREN, M. & LOIS, G. 2006. Biotope use and trends of European butterflies. *Journal of Insect Conservation* **10**:189–209
- WIJNEN, B., LEERTOUWER, H. L. & STAVENGA, D. G. 2007. Colors and pterin pigmentation of pierid butterfly wings. *Journal of Insect Physiology*. **53**: 1206-1217.
- VERMEULEN, J. & WHITTEN, T. 1999. *Biodiversity and cultural property in the management of limestone resources: Lessons from east Asia*. The International Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank, Washington D.C. 120 pp.
- VIALATTE, A., GUILLER, A., BELLIDO, A. & MADEC, L. 2008. Phylogeography and historical demography of the Lusitanian snail *Elona quimperiana* reveal survival in unexpected separate glacial refugia. *BMC Evol Biol*. **8**: 339.
- VIÉ, J.-C., HILTON-TAYLOR, C. & STUART, S. N. (eds.). 2009. *Wildlife in a Changing World – An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland, Switzerland: IUCN. 180 pp.

- VILA, M., VIDAL-ROMANI, J. R. & BJÖRKLUND, M. 2005. The importance of time scale and multiple refugia: incipient speciation and admixture of lineages in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **36**(2): 249-260.
- VIEILLEDENT, P. 1905. Lepidópteros da Região de Setúbal. *Brotéria, Lisboa*, **4**: 185-206.
- VIEJO MONTESINOS, J. L. V. 1986. Las comunidades de mariposas de la depresión del Tajo (España): Fauna de cada paisaje. *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)*. **82**(1-4): 177-187.
- VIGNE, J. D., BAILON, S. & CUISIN, J. 1997. Biostratigraphy of amphibians, reptiles, birds and mammals in Corsica and the role of man in the Holocene faunal turnover. *Anthropozoologica*, **25/26**: 587–604.
- WAHLBERG, N., OLIVEIRA, R. & SCOTT, J. 2003. Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Syst Entomol* **28**: 257-273.
- WAHLBERG, N. & SACCHERI, I. 2007. The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* **104**: 675–684.
- WAHLBERG, N. & WHEAT, C. W. 2008. Genomic Outposts Serve the Phylogenomic Pioneers: Designing Novel Nuclear Markers for Genomic DNA Extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* **57**(2): 231-242.
- WALTER, K. S. & GILLET, H. J. (eds.). 1997. *Red List of Threatened Plants*. IUCN.
- WAUGH, J. 2007. DNA Barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*. **29**: 188-197.
- WCMC, 1992. *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. Chapman & Hall, London.
- WHITTAKER, R. J. & FÉRNÁNDEZ-PALACIOS, J. M. 2007. *Island Biogeography*. Oxford University Press Inc., New York. 401 pp.
- WILCOX, B.A. 1984. "In situ conservation of genetic resources: Determinants of minimum area requirements." In *National Parks, Conservation and Development, Proceedings of the World Congress on National Parks*. McNeely, J. A. & Miller, K. R. Smithsonian Institution Press, pp. 18-30.
- WILL, K. W., MISHLER, B.D. & WHEELER, Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol.* **54**:844–851.

- WILL, K. W., RUBINOFF, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*. **20**:47–55.
- WWF & IUCN. 1994. *Centres of plant diversity. A guide and strategy for their conservation*. 3 volumes. IUCN Publications Unit, Cambridge.
- YANG, Z. & RANNALA, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, **14**: 717–724.
- ZAKHAROV, E. V., LOBO, N. F., NOWAK, C. & HELLMANN, J. J. 2009. Introgression as a likely cause of mtDNA paraphyly in two allopatric skippers (Lepidoptera: Hesperidae). *Heredity*. **102**: 590-599.
- ZERKOWITZ, B. 1946. The Lepidoptera of Portugal. *Journal of the New York Entomological Society*. **54**(1-3): 51-87; 115-166; 211-261.
- ZIEGLER, H. 2005. Pieridae holarcticae, 364 S., 3755 imagens. Disponível online: [www.pieris.ch/pieridae.html](http://www.pieris.ch/pieridae.html). Consultado em 18-IX-2009.

# **ANEXOS**

## ANEXO I – Artigo publicado

MARABUTO, E. 2008. New data on the biology and distribution of *Euchloe tagis* (Lepidoptera, Pieridae) in Portugal. *SHILAP Revta lepid.* **36**(142): 227-238.

*SHILAP Revta. lepid.*, 36 (142), junio 2008: 227-238

CODEN: SRLPEF

ISSN:0300-5267

### New data on the biology and distribution of *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) in Portugal (Lepidoptera: Pieridae)

E. Marabuto

#### Abstract

In the course of field work carried out in the spring of 2007, new populations of the endangered species Portuguese Dappled White, *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) have been found in Portugal. The results yield new insights on the habitat requirements, foodplants and possible distribution of this species in Portugal.  
KEY WORDS: Lepidoptera, Pieridae, *Euchloe tagis*, new records, distribution, biology, Portugal.

#### Novos dados sobre a biologia e distribuição de *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) em Portugal (Lepidoptera: Pieridae)

#### Resumo

Como resultado do trabalho de campo desenvolvido na Primavera de 2007, foram descobertas novas populações da Branca Portuguesa, *Euchloe tagis* (Hübner, 1807) em Portugal. À luz destes resultados, tecem-se considerações acerca dos requisitos de habitat, plantas alimentícias e a distribuição potencial da espécie em Portugal.  
PALAVRAS CHAVE: Lepidoptera, Pieridae, *Euchloe tagis*, novos registos, distribuição, biologia, Portugal.

#### Nuevos datos sobre la biología y distribución de *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) en Portugal (Lepidoptera: Pieridae)

#### Resumen

Como resultado del trabajo de campo desarrollado en la primavera de 2007, fueron descubiertas nuevas poblaciones de la Blanca Portuguesa, *Euchloe tagis* (Hübner, 1807) en Portugal. A la luz de estos resultados, se han establecido consideraciones acerca de los requisitos del hábitat, plantas nutricias y su distribución potencial de la especie en Portugal.  
PALABRAS CLAVE: Lepidoptera, Pieridae, *Euchloe tagis*, nuevas citas, distribución, biología, Portugal.

#### Introduction

The Portuguese Dappled White, *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) was originally described from Portugal based on specimens captured at “Piedade near Lisboa”, according to ZERKOWITZ (1946). However, there are several locations with “Piedade” in their name, both to the north and south of the Tagus river margin, namely: Quinta da Piedade (29SMD9301), Cova da Piedade (29SMC8680) and Aldeia da Piedade (29SMC9661). Though there is a higher probability the specimens come from the

last locality because of its mean altitude (150 m), this is not “near Lisboa” especially by 19th century standards. The problem remains and the author believes it could have been found originally to the north of Lisboa near one of the many limestone hills (e. g. near Santa Iria de Azóia, 29SMD9100) which would have had a better plant ground cover in the 19<sup>th</sup> century but are now mostly urbanized.

After the original description, a new colony was subsequently found in the 20<sup>th</sup> century occupying altitudes above 300 m in Serra da Arrábida and Serra de São Luis (Palmela) and there is also an odd (low altitude), isolated occurrence at Santa Catarina (29SNC1660) (VIEILLEDENT, 1905). ZERKOWITZ (1946) gives also erroneously Vale de Rosal (misspelt as “Val de Rosal”) as a locality where the species was found, presumably by Cândido Mendes de Azevedo but this is untrue as he only states he didn’t find it but knew of records from Alfeite (29SMC8779) (Mendes, 1910). Zerkowitz himself apparently found this species at Cacilhas and Almada, localities referred in his paper (ZERKOWITZ, 1946) but not in any other reference and very close to either Alfeite or the proposed Cova da Piedade as one of the possible type localities of *E. tagis tagis*.

It is worth noticing how close all these records are to each other in the peninsula of Setúbal. The early detection of colonies of this rare species near Lisboa must for a long time have played a role in the lack of new findings. If a lepidopterist wanted to see *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) in flight, he would only need to go to the higher parts of Serra da Arrábida where the species is usually plentiful. Until this year (2007), the species was considered to be very local and endangered in Portugal (MARAVALHAS *et al.* 2003), with records only from the calcareous Arrábida range, the western Algarve (CORLEY *et al.* 2000; GARCÍA-BARROS *et al.* 2004) and a solitary record from “Leiria” based on a specimen at the Natural History Museum of the Oporto Science Faculty captured by Maria Amélia Silva Cruz (GARCÍA-BARROS *et al.*, 2004).

As yet, there have been no surveys directed towards localities with suitable geological, topographical and botanical conditions to hold a population of *E. tagis*. According to CASINI (1993, 1996) and OLIVARES & BACK (2004), the species is calcicole and needs calcareous soils with rocky outcrops in hilly situations, preferably low altitude ridges covered with low Mediterranean scrubland, flowery meadows and open rocky outcrops with little human disturbance. Since there are few limestone / dolomitic hills and mountain ranges in Portugal, and there are few species of butterflies on the wing in these habitats at this time of the year, the detection of such an early flier (March-April) is unlikely without specifically targeted surveys.

The main motivation for the surveys made in the year 2007 derived from study of the works of GARCÍA-VILLANUEVA *et al.* (1997) and GARCÍA-BARROS *et al.* (2004) which show a very clearly defined distribution in Spain, especially in Extremadura. *E. tagis* was found by García-Villanueva and colleagues in many places with the right habitat, some very close to the international border, suggesting the probability of new colonies awaiting discovery in Portugal.

This paper reveals the discovery of two new colonies of *Euchloe tagis* in Alentejo, the confirmation of a colony in Estremadura and gives new insights into the biology, systematics and habitat requirements of this species, strengthening the idea that it may be found in other places in Portugal.

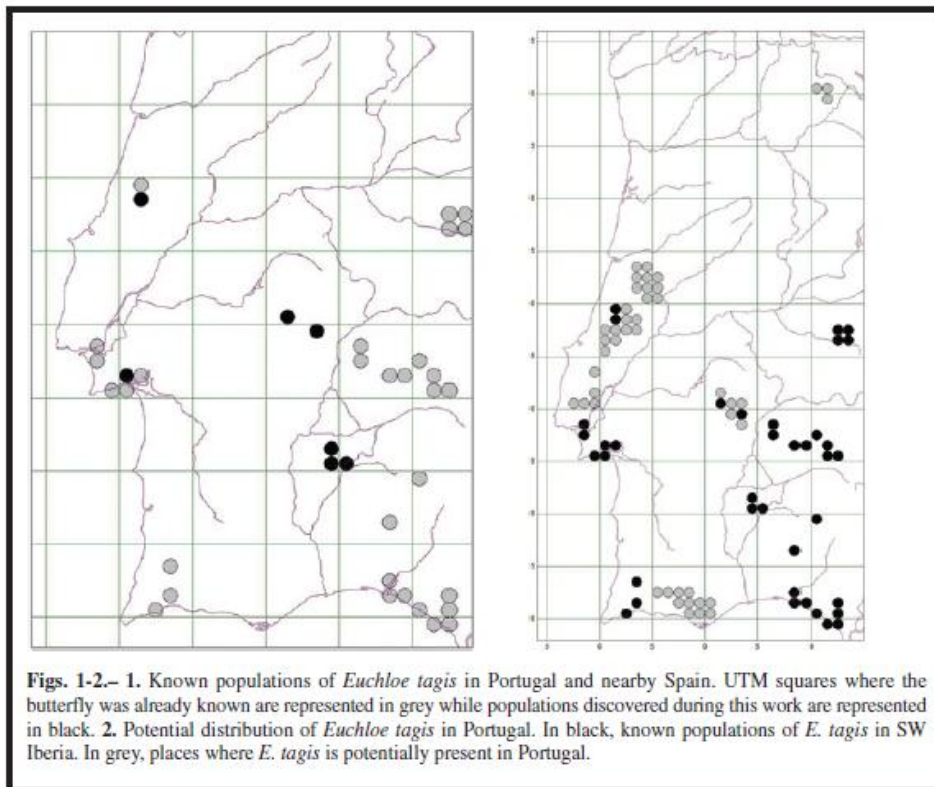
## Material and Methods

The field work was conducted during the day, in March and April 2007 together with Manuel Dinis Cortes and António Bívar de Sousa in places where the presence of *E. tagis* was predicted. Depending on the time available, the places were usually visited once or twice for a few hours. Field trips were organized to Serra de Ficalho (Baixo Alentejo), the anticline of Estremoz, between Vila Viçosa and Sousel (Alto Alentejo) and Serra dos Candeeiros, a mountain range in central Portugal included in the Serra D’Aire & Candeeiros Natural Park (Estremadura).

The forecasting of the presence of this species in places in Portugal other than Serra da Arrábida and its vicinity, depended on the combination of the presence of plants of the genus *Iberis* (the usual foodplants of *Euchloe tagis*) and the predominance of high pH, calcareous soils in hilly situations,



particularly small mountain ranges with Mediterranean influence, which had not suffered from forest fires recently. After consulting military and geological maps and flora and vegetation works on likely places, the final decision was made to explore Serra de Ficalho, the area between Vila Viçosa and Sousel and Serra dos Candeeiros. The author went with Manuel Dinis Cortes to Serra de Ficalho and Serra da Adiça on 28-III-2007 and 22-IV-2007; Manuel Dinis Cortes went alone to Vila Viçosa and Sousel on 12-IV-2007 and 23-IV-2007 and the author went with Antonio Bívar de Sousa on 19-IV-2007 to Serra dos Candeeiros. A short account of each site with UTM grid references is given below followed by a summary of the records of *Euchloe tagis*.



Habitats and localities with UTM 10 km square and altitude: (County in brackets)

#### SERRA DE FICALHO

Western base of Serra de Ficalho (Serpa) PC40 320 m.

Álamo - Sobral da Adiça (Moura) PC41 350 m.

Serra de Ficalho (Moura) PC50 510 m.

The mountain range Serra de Ficalho is a succession of three small mountain ridges with a NNE-SSE orientation in the Baixo Alentejo region of Portugal, near the border with Spain with their confluence near the city of Moura. This mountain range is formed by several reliefs with the highest being Ficalho (523 m), Adiça (477 m) and Álamo (425 m) which contrast with the peneplains of

Alentejo. Geologically and geomorphologically rather heterogeneous, the area concerned is a mosaic of mainly calcareous rocks with some siliceous intrusions. The carboniferous rocks here are grouped in two categories, Cambrian dolostones, the "Dolomitic Formation" occupying most high ground; marbles and dolomitic limestone from the Middle Ordovician at lower elevations.

The area is dominated by agricultural fields, mostly olive trees which are more or less abandoned towards the summit of the main elevations where the flora is very interesting (especially the calcicolous species) and rich with nearly 500 different taxa (PINTO-GOMES, 1995). Among the diverse plant associations present (PINTO-GOMES, 1995) the three different places where *Euchloe tagis* was found are dominated by low shrubs of *Quercus coccifera*, *Lonicera implexa* and *Cistus albidus* comprising the seral stages of degradation of the climactic Mediterranean dry forest, *Quercetea ilicis* on a basic substrate. At this point, the predominant plant associations of the habitat of *E. tagis* are the "carrascais" of *Myrto-Quercetum cocciferae* and the more degraded calcicole "estevais" *Phlomido-Cistetum albidum* but it is not present in the south facing areas with *Genisto hirsutae-Cistetum ladaniferae*. These two formations are present in a mosaic and the foodplant, *Iberis ciliata contracta* grows near outcrops of dolostone and in clearings. During March and April 2007, the butterfly was abundant, nearly dominant, flying lazily only above and near scrubland, basking frequently on the ground and rocks. Stragglers were found up to no more than 20m away, inside an olive tree plantation. The foodplant is assiduously visited by females and oviposition was observed occasionally by the author.

#### ANTICLINE OF ESTREMOZ

Vila Viçosa (Vila Viçosa) PC39 420 m

Santa Vitória do Ameixial (Estremoz) PD10 300 m

The area concerned has a NW-SE orientation and roughly goes from near the village of Sousel to Vila Viçosa, in the eastern part of Alto Alentejo and is a narrow belt of small elevations with calcareous origin attaining a mean altitude of 400 m. Geologically quite similar to Serra de Ficalho because of the shared origin of its carboniferous rocks, this anticline however, is much more metamorphosed having a higher percentage of marbles (Ordovician) surrounded by a dolomitic matrix (Cambrian). Unlike Serra de Ficalho and because the marbles are of good quality, the area is replete with marble quarries, leaving few places for the natural vegetation to thrive. Nevertheless, in some places a dense scrubland of *Quercus coccifera* develops, associated with a very interesting basophile flora, with the presence of many orchid species, *Pistacia terebinthus*, *P. lentiscus*, *Cistus albidus* and *C. monspeliensis*, corresponding to the alliance *Asparago albi-Rhamnion oleoidis*. The common seral association is *Phlomido-Cistetum albidum*, especially at the habitat margins. In more degraded situations, adjacent to the abundant olive tree crops and where the soil has been leached, *Cistus ladanifer* is often found plentifully. Here, some populations of *Euchloe tagis* were found by Manuel Dinis Cortes but very locally in the right kind of habitat remnants, where *Iberis ciliata contracta* is a common herbaceous plant of the disturbed understoreys and clearings. The two sites surveyed revealed the presence of the Portuguese Dappled White and it is most probable that it is present at least in the intermediate places where the destruction of suitable habitats has not yet taken place.

#### SERRAS D'AIRES & CANDEEIROS NATURAL PARK

Serra da Pevide (Porto de Mós) ND18 300 m

In this protected area, Antonio Bívar de Sousa and I only had the opportunity to visit the westernmost part, which is the Serra dos Candeeiros, near the town of Porto-de-Mós, at a place called Serra da Pevide. Almost all of the Natural Park lies within the most important calcareous area in the country, the "Maciço Calcário Estremenho" in central, western Portugal. Geologically these mountain ranges are composed of a very hard limestone of Jurassic origin associated with dolostone

nuclei (Serra dos Candeeiros and Serra D'Aire), the range attaining its maximum altitude at 678 m a.s.l. In spite of relatively high rainfall (P=1000 mm/y), the high permeability of the soil and rocks produces an extremely dry local environment with an absence of permanent water courses in most areas. The vegetation is very variable with a predominance of xerophilous species. In the more impermeable areas, which have not suffered the effect of the frequent wildfires, a lush mesophile forest develops, the *Arisaro-Quercetum broteroi* where *Quercus faginea* ssp. *broteroi* is the dominant species. However, the greatest part of the area is either occupied by the sere *Lonicero implexae-Quercetum rotundifoliae*, consisting of much degraded meadows of *Teucrio capitati-Thymetum sylvestris helianthemetosum violaceae* or other meadow communities in a mosaic with non-burnt areas of *Quercus coccifera* scrubland, here the endemic *Quercetum coccifero-airensis*. The only *Iberis* species and possible foodplant found in this area is the vulnerable, Portuguese endemic, *Iberis procumbens* ssp. *microcarpa* which develops on rocky calcareous hills of central western and central southern Portugal. This is presumably the foodplant of the Serra da Arrábida population too. The few specimens of *E. tagis* observed were seen in a typical "carrascal" of *Quercus coccifera* with a good ground cover of herbaceous plants and low shrubs, especially *Cistus albidus*, *Thymus zygis* ssp. *sylvestris* and *Lonicera implexa*, among others.

#### Abbreviations and symbols:

Fw.: Forewing  
 Hw.: Hindwing  
 Sp.: Specimens seen.  
 W: Western  
 EM: Eduardo Marabuto  
 DC: Manuel Dinis Cortes  
 BS: António Bivar de Sousa  
 JPC: João Pedro Cardoso

#### Provinces:

AAL: Alto Alentejo  
 BAL: Baixo Alentejo  
 E: Estremadura

#### Records chronologically organised:

BAL: Serra de Ficalho (Moura) (29SPC50, 510 m), 26-III-2007 (12 sp. EM & DC).  
 AAL: Vila Viçosa (Vila Viçosa) (29SPC39, 420 m), 12-IV-2007 (6 sp. DC).  
 E: Serra da Pevide (Porto de Mós) (29SND18, 300 m), 19-IV-2007 (1 sp. EM & BS).  
 BAL: W base of Serra de Ficalho (Serpa) (29SPC40, 320 m), 22-IV-2007 (20 sp. EM & DC).  
 BAL: Álamo – Sobral da Adiça (Moura) (29SPC41, 350 m), 22-IV-2007 (3 sp. EM & DC).  
 AAL: Santa Vitória do Ameixial (Estremoz) (29SPD10, 300 m), 23-IV-2007 (3 sp. DC).

#### Morphology and systematics

Five subspecies of *E. tagis* have been described from the Iberian Peninsula:

- 1.– *Euchloe tagis tagis* (Hübner, 1804): Arrábida Range south of Lisboa (Portugal), South Spain west of Sevilla.
- 2.– *E. tagis granadensis* (Ribbe, 1910): South Spain East of Malaga (Betic range).
- 3.– *E. tagis castellana* (Verity, 1911): Spain to the north of Sierra Morena.
- 4.– *E. tagis alhajaræ* Olivares & Back, 2004: Sierra de Aracena (Western Sierra Morena).

5.– *E. tagis davidi* Torres Mendez & Verdugo Páez, 1985: Cadiz and Huelva along the coast. Synonymised with *E. tagis tagis* by OLIVARES & BACK (2004).

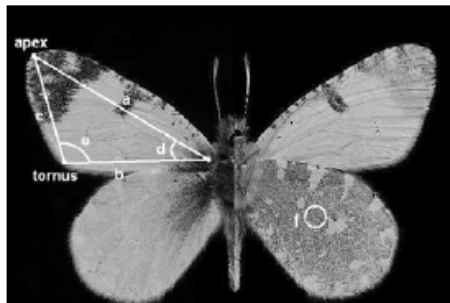
Some populations have not yet been assigned to a specific subspecies or been formally separated from known taxa (see OLIVARES & BACK, 2004).

From a taxonomic point of view, the Portuguese Dappled White is a complex species to analyse for its multiple geographical and individual forms, many different taxa have been named, even recently (CASINI, 1993; OLIVARES & BACK, 2004). There is probably genetic isolation of many colonies within the wide distributional area of this species: from Algeria north to Portugal and east to Italy. Some of the subspecies appear to be real separate entities although no genetic studies have been made so far.

In Portugal, *E. tagis* is a very poorly known species and until this work, only the population of Serra da Arrábida was still known to thrive. All south-western Iberian populations were grouped in the nominal subspecies which is considered to also occur in southern Spain. According to OLIVARES & BACK (2004), this taxon is characterized by:

Reduced white markings on the hindwing underside. Olive green to yellowish green hindwing underside. Abundant black scales on the base, costa and apex of the forewing upperside. Pure white ground colour on the forewing upperside. The largest subspecies, with a mean forewing length greater than 20 mm. Considering these characters and others available in the literature and the lack of a straightforward placement of the new populations just looking at the distribution of any of the known subspecies, a small sample of specimens ( $n = 18$ ) from all populations known in Portugal (Serra da Arrábida ( $n = 8$ ), Serra de Ficalho ( $n = 3$ ), Anticline of Estremoz ( $n = 6$ ) and Serra dos Candeeiros ( $n = 1$ )) was analysed for phenotypic differences. These specimens are in the personal collections of EM ( $n = 8$ ), DC ( $n = 4$ ) and JPC ( $n = 6$ ).

A preliminary analysis using biometrics and wing pattern was undertaken on the available sample using digital images of the specimens where all the parameters (ISO, aperture, shutter speed, etc.) were manually defined and standardized (ISO: 200; F20; 1/160). With the aid of an image analysis software (Image J version 1.38x, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), measurements were made using three landmarks on the left forewing of each specimen: forewing costal and basal length, forewing width between the termen and the apex and the amplitude of two angles: angle 1 connecting the apex-base-termen and angle 2 connecting apex-termen-base. Furthermore, the mean amount of red, green and blue (RGB/3) was measured on a standardised area on the underside of the left hindwing (Fig. 3).



**Fig. 3.**– Measured phenotypic features on the forewing upperside and hindwing underside in *Euchloe tagis*: a) fw costal length; b) fw basal length; c) forewing width; d) apex-base-termen angle; e) base-termen-apex angle; f) Area of mean (RGB/3) measure.

This role of biometric characters has been chosen because if on one hand it's widely accepted that forewing dimensions and proportions are less variable intra specifically among Lepidoptera because they are directly in control of flight capability (STRAUSS, 1990), differences that may arise from the analysis of allopatric populations of a species may indicate some degree of local adaptation and genetic distance. Here, the overall forewing shape is very important and the inclusion of two angle measures traduces the need to evaluate the forewing "acuteness" as it is expected specimens and populations with more acute forewings may have to withstand stronger winds and have the capability of longer distance dispersal because of increased aerodynamics.

When at rest, the Portuguese Dappled White conceals the forewing vertically like most butterflies do and the greenish hindwing covers

completely the white portions of the forewing. The single colour measure on the hindwing underside is therefore connected with the evaluation of hindwing colouration and camouflage of the butterfly at rest. This character may evolve with the surrounding habitat and the vegetation present so is a good starting point for speculations on the changes a population may suffer in allopatry.

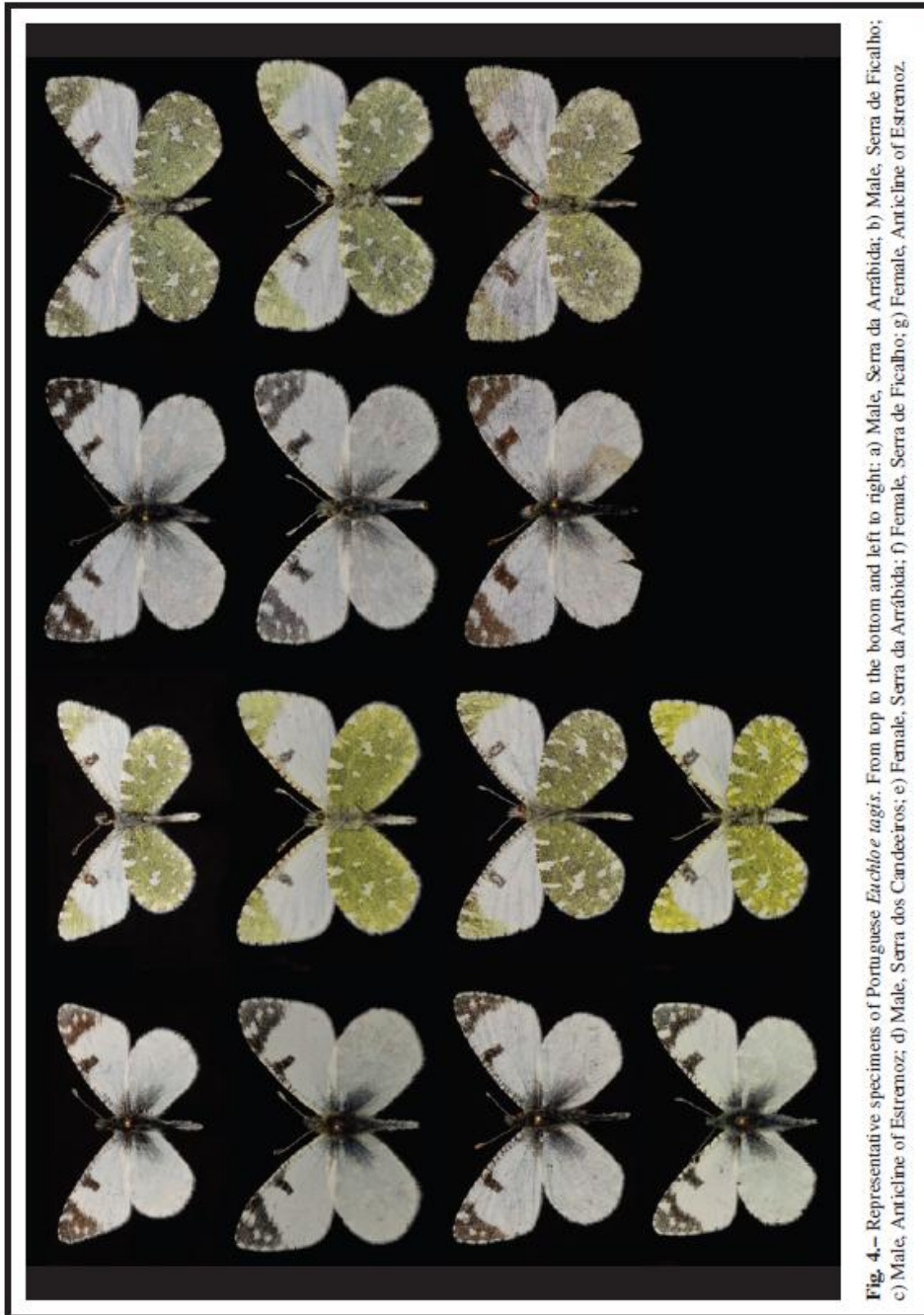
According to all these characters, the first conclusion is that females are consistently larger than males, which have more pointed, shorter forewings.

The population from Serra da Arrábida and surrounding area is apparently the geographically closest to the nominal *E. tagis tagis* described by Hübner and therefore is here (as has always been) considered to be the same as the type population. A representative couple is figured (Fig. 4a & 4b). Specimens coming from this small mountain range, where the species flies above 300 m a. s. l. in clearings and outcrops of calcareous Jurassic rock are characterized by the small average size (male fw length mean = 19,0 mm), reduction of the white markings on the hindwing underside which though variable, is usually dark-yellowish green (i. e. with a high concentration of black scales). Forewing upperside is pure white with solid black apex in both sexes, even in newly emerged specimens and greyer on the hindwings. Males often have very acute forewings (male mean angle  $2 = 106,91^\circ$ ) as in Fig. 4a while females have broader forewings and are usually larger.

The newly found population from Serra de Ficalho and Serra da Adiça, occupies most calcareous outcrops in a relatively small area of three 10 x 10 km UTM squares. Specimens are somewhat larger than the typical form (fw length mean = 20,0 mm) and are generally of a lighter greenish-yellow hindwing underside, the concentration of black scales being lower. Furthermore, the apex of the forewing is not pure black but dark-grey, especially on the female and males have less pointed forewings than the previously described population. In some specimens, ground colour is not pure white but slightly yellowish-white. Otherwise, these specimens are very similar to nominal *E. t. tagis* and should be ascribed to this taxon, despite some similarities and remarkable geographical proximity (50 km in a straight line) to the recently described *E. tagis alhajarae* (Olivares & Back, 2004). A representative couple is figured on Fig. 4b & 4f.

The Anticline of Estremoz is a calcareous outcrop that stretches for 37 km but is only around 4km wide. *E. tagis* was found in both ends of this area and specimens from these two localities (Santa Vitória do Ameixial and Vila Viçosa) are indistinguishable as expected and they probably maintain an active genetic flow. Here, as in Serra de Ficalho, the contact with other Portuguese populations is virtually impossible and this population is a natural extension of the Spanish occupying the basic ridges of southern Badajoz province. Specimens' upperside ground colour is pure white with black to grey apex of the forewings which also are much less pointed, the insects appearing more compact. The underside of the hindwing is dark green to yellowish green and the extent, size and definition of the white spots is highly variable. There are specimens with reduced white spotting resembling *E. t. tagis* but others are highly speckled with much defined large white spotting, resembling *E. tagis castellana* (Verity, 1911) from central Spain (Fig. 4c & 4g). The status of this population is for now indefinite but the author believes this still belongs to *E. t. tagis* though transitional to *E. t. castellana*. Further genetic studies may reveal a certain degree of introgression.

The only population located to the north of river Tagus was found in a small area near the town of Porto-de-Mós in the mountain range of Serra dos Candeeiros but it is expected to be a widespread species along all the mountain range in similar conditions. As only a single male specimen was located during the short survey, the characters that follow cannot be considered representative of the whole population and a good deal of variation is expected. However, this is a very different butterfly from all the other known populations of *E. tagis*: Upperside ground colour light cream-coloured and black markings well defined. Forewings bear a dark-grey apex, strong black suffusion at the base and a large, rectangular black discoidal spot. The forewing of the examined specimen is the least pointed of all measured males (angle  $2 = 100,35^\circ$ ). Underside of forewings with a well defined bright green apex with a variegated indefinite dark pattern (unlike ssp. *tagis* but like some specimens from the Anticline of Estremoz, except the bright green



**Fig. 4.**— Representative specimens of Portuguese *Euchloe tagsis*. From top to the bottom and left to right: a) Male, Serra da Arrábida; b) Male, Serra de Ficalho; c) Male, Anticlina of Estremoz; d) Male, Serra dos Candeeiros; e) Female, Serra da Arrábida; f) Female, Serra de Ficalho; g) Female, Anticlina of Estremoz.

colouration). Hindwing underside is of a very bright green (lowest RGB mean = 88,19) with abundant “jagged” bright white spots (especially the large discoidal and marginal spots) which appear highly contrasted. Under the microscope, when compared with bright (newly emerged) specimens from other populations (Serra de Ficalho, especially), the yellow scales are brighter coloured and in a much denser net while the concentration of black scales is much higher. Although OLIVARES & BACK (2004) minimize the underside ground colour as a taxonomic tool for *E. tagis*, because of their age, the author believes here this is not only a matter of how old the specimen is; difference from specimens coming from other populations is striking. Moreover, the overall colouration (light yellowish-white), contrast and shape of the hindwing white spots merit special considerations, this population maybe deserving subspecies status. This should become clearer when more specimens are available for study in a near future.

All measured characters are summarized and compared with some available in the literature from other populations on Table 1.

Population	Quantitative characters											Qualitative characters				
	N		Fw length (mm)		Fw basal length (mm)		Fw width (mm)		Fw angle 1 (apex-basetermen)		Fw angle 2 (apex-terminbase)		RGB Mean	Upperside Fw	Underside	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		Ground colour	Ground colour	White spotting
Arrábida	6	2	19,0 (16,9 - 20,9)	20,0	13,5	14,7	10,6	11,8	35,50	38,29	106,91	101,45	113,97	White	Yellowish green	Small and scarce
Ficalho	2	1	19,8 (19,6 - 20,0)	20,4	14,3	15,2	11,8	11,6	37,94	36,95	102,59	103,48	100,23	White - light creamish-white	Light-yellowish green	Small, abundant
Estremoz anticline	5	1	18,5 (17,5 - 19,1)	20,3	13,3	15,6	10,6	11,4	37,01	37,00	102,97	100,17	102,18	White	Dark yellowish green	Large, abundant
Candeeiros	1	—	18,7	—	13,7	—	11,3	—	39,25	—	100,35	—	88,19	Creamish-white	Bright, light green	Large, abundant
<i>E. t. granadensis</i> (1)			18,51											White	Variable	Variable
<i>E. t. alhajurue</i> (1)			20,01											Slightly cream-coloured	Light green - yellowish green	Abundant
<i>E. t. castellana</i> (2)			14 - 15											White	Dark green	Medium, abundant
<i>E. t. bellezina</i> (2)			18 - 19											White	Dark green	Very large, abundant

**Table 1.**— Diagnostic characters involving some populations of *E. tagis* in Portugal and elsewhere. The numbers are referable to arithmetic means from the representative samples of each population in Portugal. <sup>(1)</sup>: OLIVARES & BACK (2004); <sup>(2)</sup>: HIGGINS & RILEY (1983).

### Conservation and comments on the discovered populations

Every place where the presence of *E. tagis* has been detected in Portugal in recent times, either the known colony of Arrábida or the newly discovered shares a number of characters concerning the habitat, presence of foodplant and geology which are important to summarize:

1.— Presence of the foodplant, crucifers of the genus *Iberis*, which in Portugal has five taxa: *Iberis ciliata contracta*, *Iberis ciliata welwitschii*, *Iberis procumbens procumbens*, *Iberis procumbens microcarpa* and *Iberis pectinata*. Abroad, it is known to feed on *Biscutella* spp. (TOLMAN & LEWINGTON, 1997) and *Eruca vesicaria* (OLIVARES & BACK, 2004) but I think these are only used as minor hostplants when *Iberis* is not readily available.

2.— A calcareous substrate, especially of Jurassic or Ordovician age is apparently needed and this is probably the main factor as it conditions the plant associations present and the presence of the foodplant.

3.– *E. tagis* seems to prefer altitudes above at least 300 m a. s. l. in Portugal (pers. obs.) and above 500 m in Extremadura, Spain (GARCÍA-VILLANUEVA *et al.*, 1997) and hilly situations with rock outcrops.

4.– The habitats where the butterfly is to be found are always the seral stages of the climactic forests of xerophilous hard-leaved oaks, namely of *Quercus faginea* (Arisaro-*Quercetum broteroi*) or *Quercus rotundifolia* (Myrto-*Quercetum rotundifoliae*) where *Quercus coccifera* is predominant.

Places with these characteristics are not very common in Portugal, where the predominant rock types are granites and schists making the potential distribution of *E. tagis* very patchy and irregular. The results presented in this work are important because once considered a very rare, endangered butterfly in Portugal (MARAVALHAS *et al.* 2003), the Portuguese Dappled White is now known to occur at least in four (five if the western Algarve records are true) different colonies in southern Portugal. A lowering in threatening level should be considered in due time for the elaboration of a Portuguese Red Data Book for Butterflies.

Nonetheless, it is clear from the records globally (GARCÍA-BARROS *et al.* 2004) and presented here that this is a stenochorous species, limited to the right kind of habitat and dependent on rare crucifers. Not being found on other substrates other than those of calcareous origin, colonies are rather isolated from each other because of unsuitable habitat between them. This may be reflected in some genetic differentiation as there are several described subspecies in Spain, France, Italy, Algeria and Morocco. The status of the various populations is somewhat unresolved and until there is genetic evidence, any grouping is just tentative. The author believes all the Portuguese populations south of river Tagus are closely related (*E. t. tagis*) even though there seems to be some contact with other taxa (*alhajarae* and *castellana*). Their vicariance thus, may be fairly recent while the population north of river Tagus is more differentiated and may represent an undescribed subspecies requiring separate conservation measures. *E. tagis* is ecologically so different from the other species of the genus in Portugal and the Iberian Peninsula, its presence alone in a given place should be regarded as a bioindicator of a healthy but sensible ecosystem. The habitats where it is found are very rich in plant and animal species and prone to endemism. Because butterflies usually share their sympathy among people as few other animal groups do, *E. tagis* (together with orchids) is a good umbrella species for conservation of these habitats.

Nationally, as Serra da Arrábida and Serra dos Candeeiros are Natural Parks and Serra de Ficalho and Adiça are NATURA 2000 sites, only the populations from the Anticline of Estremoz are not inside a legally protected area. They are undoubtedly the most endangered because intensive extraction of ornamental marbles is still taking place in the region and brings much income to local people. The other populations share the threat of wildfires (especially problematic at Serra de Aire & Candeeiros Natural Park which has its natural vegetation reduced to the earliest stages of succession in most of the area and is subject to almost annual fires) and clearance for olive-tree crops, which has not taken place recently. Such an interesting species therefore deserves special attention and adequate habitat management for its presence and genetic background should be maintained together with its special ecosystem.

#### Distribution of *Euchloe tagis* in Portugal

The knowledge that *E. tagis* has highly specialized ecological requirements raises doubts concerning the reliability of certain earlier records of the species. Some historical records come from localities I would consider doubtful for this species especially because of low altitude and absence of foodplant, like the Algarve records which are either from siliceous soils with unsuitable habitat (29SNB33 in GARCÍA-BARROS *et al.* 2004) or in rather developed, low altitude localities without the foodplant but with the right geology (Luz and Quinta da Rocha in CORLEY *et al.* 2000; Corley pers. comm.). Although I consider these three records from the western Algarve as unconfirmed, they have been included in the Portuguese distribution of the butterfly particularly because colonies



of the species are expected in the Algarve on the wide calcareous belt known as “Barrocal” which has its western limits near Luz and Quinta da Rocha.

Records of *E. tagis* in Portugal are summarized on Fig. 1, showing previous records (grey) and the newer records (black). This species was known only from near the coast, there being no connection with the populations in southern Spain (GARCÍA-VILLANUEVA *et al.* 1997, GARCÍA-BARROS *et al.* 2004). Now it is obvious that *E. tagis* may be much more widespread in southern and central Portugal and new colonies can be expected to be found. Because of the very precise requirements this species apparently has in Portugal, a 10 km square grid map has been produced showing suitable places where *E. tagis* has not been cited but may possibly be found (Fig. 2). This map is merely indicative of the possible presence of the Portuguese Dappled White and should be interpreted as the conjunction of several abiotic (altitude above 300 m, calcareous mountains and outcrops) and biotic (scrubland and maquis with basophile elements where the foodplant is present) features known to be favourable to the presence of the butterfly. However, colonies could occur at lower altitudes where other local conditions permit, or conversely the potential vegetation of an area might be ideal but has been destroyed by human activity and is no longer able to sustain *E. tagis*.

### Final Remarks

The Portuguese Dappled White, although first described in Portugal more than 200 years ago has remained almost unknown in the country. Only now are we beginning to understand the life history, requirements and ecology of this butterfly with several colonies now known from the country as well as the foodplants and habitats used. Recent studies by Spanish and Italian lepidopterists, however have unveiled much of its biology and systematics in other countries where this species is to be found showing a high degree of differentiation.

This work shows that this stenochorous, rare and specialized species is more widespread than previously thought. If oriented surveys are made towards this species, other colonies may be found where the right kind of ecosystem is present. Moreover, the systematic relationship between the many subspecific taxa throughout the range of this species is still unknown and authors have based their descriptions and biogeographical assumptions merely on morphological distinctness and distribution. A full genetic analysis using molecular markers may solve these taxonomic problems and provide the basis for an integrated conservation of the species as a whole and at a smaller scale. Evaluating which populations are most in need of conservation measures either because of external factors or those derived from loss of genetic variability will be crucial for the regional management policies on this species and its habitats.

### Acknowledgements

I am most grateful to Manuel Dinis Cortes and António Bívar de Sousa for companionship and collaboration in the field, without them this work would have been much more difficult to accomplish. Also to Lúcia Porto Góis, Maria Vitória Marabuto, Florentino Marabuto and Antónia Brito for support during the writing of the manuscript and to João Pedro Cardoso for loan of specimens and friendship through the writing process of the paper. Finally, the author especially wishes to thank Martin Corley on ideas concerning the manuscript, for its linguistic revision and help with literature.

### BIBLIOGRAPHY

- CASINI, P. M., 1993.– Première station pour l’Italie péninsulaire d’*Euchloe tagis* Hübner (1804) et description de la ssp. nov. *calvensis* (Lepidoptera: Pieridae).– *Linneana Belg.*, **14**(1): 3-13.  
 CASINI, P. M., 1996.– Deux nouvelles stations d’*Euchloe tagis* (Hübner, 1804) en Italie centrale. Élevage d’*Euchloe tagis calvensis* Casini (1993), *Euchloe ausonia* (Hübner, 1804) et *Anthocharis cardamines*

- (Linnaeus, 1758) au Mont Calvi (Livorno, Italie centrale) (Lepidoptera: Pieridae).– *Linneana Belg.*, **15**(7): 275-280.
- CORLEY, M. F. V., GARDINER, A. J., CLEERE, N. & WALLIS, P. D. 2000.– Further additions to the Lepidoptera of Algarve, Portugal (Insecta: Lepidoptera).– *SHILAP Revta. lepid.*, **28**(111): 245-319.
- GARCÍA-BARROS, E., MUNGUIRA, M. L., MARTÍN CANO, J., ROMO BENITO, H., GARCÍA PEREIRA, P. & MARAVALHAS, E. S., 2004.– Atlas de las mariposas diurnas de la Península Ibérica e islas Baleares (Lepidoptera: Papilionoidea & Hesperioidea).– *Monografías S.E.A.*, **11**: 1-228.
- GARCÍA-VILLANUEVA, V., BLÁZQUEZ CASELLES, A., NOVOA PÉREZ, J. M. & NIETO MANZANO, M. A. 1997.– *Atlas de los lepidópteros ropalóceros de extremadura (Hesperioidea & Papilionoidea)*: 122 pp. Instituto Extremeño de Entomología. Badajoz.
- HIGGINS, L. G. & RILEY, N. D., 1983.– *Butterflies of Britain & Europe*: 384 pp. HarperCollins Publishers, London.
- MARAVALHAS, E., 2003.– *As borboletas de Portugal*: 455. Ed. Vento Norte.
- MENDES, C. A., 1910.– Lepidópteros de Portugal. II. Lepidópteros de Val de Rosal (Caparica de Monte) em 12 e 13 de Abril.– *Brotéria*, **9**: 129-132.
- OLIVARES, J. O. V. & BACK, W., 2004.– *Euchloe tagis* (Hübner, [1804]) (Lepidoptera, Pieridae) en Andalousie et description d'une sous-espèce nouvelle.– *Linneana Belg.*, **19**(5): 229-240.
- PINTO-GOMES, C. J., 1995.– *A Serra de Ficalho, Flora e vegetação*: 153 pp. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Direcção regional do ambiente e recursos naturais do Alentejo.
- STRAUSS, R. E., 1990.– Patterns of quantitative variation in lepidopteran wing morphology: the convergent groups Heliconiinae and Ithomiinae (Papilionoidea: Nymphalidae).– *Evolution*, **44**(1): 86-103.
- TOLMAN, T. & LEWINGTON, R., 1997.– *Collins Field Guide to Butterflies of Britain & Europe*: 320 pp. HarperCollins Publishers, London.
- VIEILLEDENT, P., 1905.– Lepidópteros da Região de Setúbal.– *Brotéria*, **4**: 185-206.
- ZERKOWITZ, B., 1946.– The Lepidoptera of Portugal.– *Jl N. Y. ent. Soc.*, **54**(1-3): 51-87; 115-166; 211-261.

E. M.  
 Rua Maestro Frederico de Freitas, 5-7º- Dto.  
 P-1500-399 Lisboa  
 PORTUGAL / PORTUGAL  
 E-mail: edu\_marabuto@netcabo.pt

(Recibido para publicación / Received for publication 6-IX-2007)  
 (Revisado y aceptado / Revised and accepted 5-X-2007)

## ANEXO II– Artigo publicado

MARABUTO, E. 2009. -> Artigo de divulgação para a revista LIBERNE, edição de Dezembro 2009 (*in press.*)

# ESPÉCIES EM VIAS DE EXTINÇÃO EM PORTUGAL ?

Branca-Portuguesa – *Euchloe tagis*

Texto - **Eduardo Marabuto**



No início de Março, quando os primeiros raios de sol primaverais fazem despontar as primeiras flores de rosmaninho, as orquídeas mais singulares e aquecem as encostas das serras calcárias de Portugal surge uma pequena borboleta branca a voar nervosamente nas cumeadas e nas zonas de matagal mediterrânico mais bem conservado, a Branca-Portuguesa.

Esta borboleta diurna, conhecida cientificamente por *Euchloe tagis*, pertence à família Pieridae que inclui também outras espécies conhecidas em Portugal como as borboletas da couve (género *Pieris*), a Maravilha (*Colias croceus*) ou a Cleópatra (*Gonepteryx cleopatra*) que vemos habitualmente a voar nos nossos campos.

O que torna esta borboleta tão especial entre as cerca de 2500 espécies que existem no nosso país é o facto interessante de ter sido descrita pela primeira vez para a ciência segundo exemplares encontrados em Portugal, mais especificamente na península de Setúbal no final do século XVIII. Depois, foi descoberta em colónias sempre isoladas entre Portugal e o noroeste de Itália, sendo ainda conhecidas duas populações em Marrocos e outra na Argélia. Curiosamente, durante perto de 200 anos até 2007, a Branca-Portuguesa apenas foi observada com alguma regularidade na Serra da Arrábida, a sua biologia em Portugal era praticamente desconhecida e é considerada “Em Perigo de Extinção” no mais recente livro *As borboletas de Portugal*, de Ernestino Maravalhas.

Em 2007 foi descoberta noutras três Serras portuguesas onde predominam substratos bem consolidados de origem sedimentar e que ainda apresentam algum matagal mediterrânico bem desenvolvido. Estas são a Serra da Adiça, no interior do Baixo Alentejo; as elevações calcárias do Anticlinal de Estremoz, entre Sousel e Vila Viçosa e no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros.

A *Euchloe tagis* é uma especialista ecológica que depende não só dos solos calcários como as suas lagartas apenas utilizam algumas plantas para o seu desenvolvimento: as

Assembleias (da família das Crucíferas, couves e afins) pertencentes ao género *Iberis*, que em Portugal possui três espécies.

Os habitats onde ocorre esta borboleta são muito ricos em biodiversidade, o que é facilmente comprovado com um passeio em qualquer destas serras: à notável diversidade florística, onde se destacam as espécies aromáticas como alecrim, rosmaninho, tomilhos e madressilvas e as espécies mais singulares (e endémicas) de orquídeas há que associar uma enorme riqueza em animais que vão desde os milhares de espécies de insectos aos mais conhecidos Lince Ibérico (que possivelmente partilha o seu habitat com a *E. tagis* na Serra da Adiça) e muitas espécies de aves de rapina.

Contudo, à semelhança de muitas outras espécies, os principais factores de ameaça às suas populações centram-se nas alterações ao uso do solo e consequente perda e degradação de habitats. A urbanização crescente é um problema sério apontado como o principal motivador da extinção de algumas populações perto de Almada no séc XX mas o advento recente da olivicultura intensiva no Alentejo com recurso a cultivares de intensa produção mas exigentes em herbicidas e pesticidas coloca em risco importantes manchas de habitat e a prevalência desta espécie na Serra da Adiça e na zona de Vila Viçosa e Estremoz. Finalmente, um factor de coacção importante é o desempenhado pelas explorações de inertes como os calcários e os mármore, de importância relevante no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros e principalmente no Anticlinal de Estremoz. Aqui, as pedreiras a céu-aberto são tão abundantes que os habitats propícios à espécie são agora exíguos e fragmentários.

O valor desta borboleta para os ecossistemas reside no facto de ser um bom bio-indicador de qualidade e sustentabilidade porque é sensível às alterações operadas sobre os seus habitats e responde muito rapidamente a elas. Ao conservarmos esta espécie estamos a conservar um legado e um ecossistema que alberga muitas outras espécies de valor incalculável. 🌱

## ANEXO III

### Protocolo de extracção (Protocolo E.Z.N.A. para Tecido, modificado.)

- 1 → Fraccionar duas patas de cada exemplar e para um tubo de 1,5ml. Adicionar 200µl de Buffer TL.
- 2 → Adicionar 25µl de OB Protease reconstituída. Vortex para misturar bem e incuba-se num banho seco com agitação a 55°C até ao dia seguinte.
- 3 → Centrifugar durante 5 minutos a  $\geq 13000x$  g. Aspira-se o sobrenadante e transfere-se para um tubo esterilizado, deixando o soluto.
- 4 → Adiciona-se 220µl de buffer BL e vortex para misturar. Incuba-se a 70°C durante 10 minutos.
- 5 → A preparação das colunas é feita adicionando 100µl de Equilibration Buffer e centrifugam-se a  $\geq 13000$  x g por 20 segundos.
- 6 → Adicionar 220µl de etanol absoluto à amostra e misturar veementemente.
- 7 → transferir toda a amostra para a coluna incluindo qualquer precipitado que se possa ter formado. Centrifugar a 10000x g por 60 segundos e descartar o produto.
- 8 → Adicionar 500µl de Buffer HB e centrifugar a 10000x g por 60 segundos. Descartar o produto.
- 9 → Adicionar 700µl de DNA Wash Buffer diluído previamente em etanol absoluto. Centrifugar a 10000x por 60 segundos. Descarta-se o produto.
- 10 → Repete-se o passo anterior com mais 700µl de DNA Wash Buffer.
- 11 → Centrifuga-se a coluna à velocidade máxima ( $\geq 13000x$  g) por 2 minutos para secar a coluna (Hibind DNA Mini Column).
- 12 → Coloca-se a coluna num tubo de 1,5ml esterilizado cuja tampa foi previamente separada. E adiciona-se 100µl de Elution Buffer previamente aquecido (10mM tris, pH 8,5). Coloca-se a 70°C durante 3 minutos.
- 13 → Para completar a eluição, centrifugar a  $\geq 13000x$  g por um minuto. Repete-se este passo utilizando o produto da eluição.

Obtêm-se uma solução com um volume de 100µl, contendo ADN em suspensão.

## **Protocolo de Amplificação do fragmento 5' do gene COI de ADNmt**

### Receita:

ddH<sub>2</sub>O: 6,9 µl

5xPCR buffer (without MgCl<sub>2</sub>) 5 µl

dNTP-Mix 2mM 1 µl

MgCl<sub>2</sub> 25mM 2 µl

Primer 1 20pm 1 µl

Primer 2 20pm 1 µl

BSA 5 µl

Taq Polymerase 0,1 µl

DNA 3 µl

### Perfil de temperatura:

A reacção de PCR foi levada a cabo em termocicladores GeneAmp® PCR-System 2700 da ABI Biosystems® segundo o seguinte perfil:

Desnaturação inicial a 94°C durante 1 minuto seguida de 5 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 1 minuto de annealing a 45°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Depois, mais 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 1,5 minutos de annealing a 50°C e 1 minuto de extensão a 72°C. No final, 5 minutos de extensão a 72°C.

## ANEXO IV

### Amostras utilizadas para a análise genética

Haplotipo	Taxon	Fonte	Data	Local	Voucher
H28	<i>E. tagis</i> sp.	BS	21-V-2007	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA003
H4	<i>E. tagis castellana</i>	JM	18-V-2007	ESPAÑA - Loeches, Madrid	ETA004
H25	<i>E. tagis</i> sp.	BS	IV-2007	ESPAÑA - Caspe	ETA007
H27	<i>E. tagis tagis</i>	EM	17-III-2007	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA013
H7	<i>E. tagis</i> sp.	EM	26-III-2007	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA014
H17	<i>E. tagis</i> sp.	EM	26-III-2007	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA015
H30	<i>E. tagis</i> sp.	EM	19-IV-2007	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA018
H25	<i>E. tagis</i> sp.	BS	21-V-2007	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA021
H25	<i>E. tagis granadensis</i>	BS	III-2007	ESPAÑA - Sierra Elvira	ETA022
H25	<i>E. tagis granadensis</i>	BS	III-2007	ESPAÑA - Sierra Elvira	ETA023
H33	<i>E. tagis castellana</i>	JM	18-V-2007	ESPAÑA - Loeches, Madrid	ETA025
H25	<i>E. tagis tagis</i>	EM	10-II-2008	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA026
H17	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA027
H18	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA028
H7	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA029
H7	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA030
H17	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA031
H7	<i>E. tagis</i>	EM & HG	28-II-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA032
H26	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	15-III-2008	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA033
H27	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	15-III-2008	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA034
H14	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	15-III-2008	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA035
H28	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	15-III-2008	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA036
H7	<i>E. tagis</i>	EM & IR	29-III-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA037
H16	<i>E. tagis</i>	EM & IR	29-III-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA038
H17	<i>E. tagis</i>	EM & IR	02-IV-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA039
H7	<i>E. tagis</i>	EM & IR	02-IV-2008	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA040
H1	<i>E. tagis bellezina</i>	PB	13-IV-2008	FRANÇA - Ginasservis, Provença	ETA042
H1	<i>E. tagis bellezina</i>	PB	13-IV-2008	FRANÇA - Ginasservis, Provença	ETA043
H1	<i>E. tagis bellezina</i>	PB	13-IV-2008	FRANÇA - Ginasservis, Provença	ETA044
H31	<i>E. tagis</i>	EM	27-IV-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA045
H14	<i>E. tagis</i>	EM	27-IV-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA046
H5	<i>E. tagis</i>	EM	27-IV-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA047
H13	<i>E. tagis</i>	EM	27-IV-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA048
H31	<i>E. tagis</i>	EM	27-IV-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA049
H28	<i>E. tagis</i>	EM	14-V-2008	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA050
H21	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA051
H15	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA052
H14	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA053
H11	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA054
H5	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA055
H14	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA056
H5	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA057
H5	<i>E. tagis</i>	EM & PP	17-V-2008	PORTUGAL - Sousel	ETA058
H25	<i>E. tagis</i>	BS	V-2008	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA060
H25	<i>E. tagis</i>	BS	V-2008	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA061
H21	<i>E. tagis</i>	BS	V-2008	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA062
H26	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	25-II-2009	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA063
H25	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	25-II-2009	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA064
H26	<i>E. tagis tagis</i>	EM & JPC	25-II-2009	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA065
H7	<i>E. tagis</i>	EM	08-III-2009	PORTUGAL - Serra da Adiça	ETA066
H34	<i>E. tagis tagis</i>	EM	19-III-2009	PORTUGAL - Serra de São Luís	ETA067
H25	<i>E. tagis tagis</i>	EM	19-III-2009	PORTUGAL - Serra de São Luís	ETA068
H22	<i>E. tagis tagis</i>	EM	19-III-2009	PORTUGAL - Serra de São Luís	ETA069
H31	<i>E. tagis tagis</i>	EM	19-III-2009	PORTUGAL - Serra de São Luís	ETA070
H5	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Sousel	ETA071
H16	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA072
H14	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA073
H14	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA074

H14	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA075
H31	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA076
H14	<i>E. tagis</i>	EM & IR	22-III-2009	PORTUGAL - Vila Viçosa	ETA077
H29	<i>E. tagis</i>	EM & PP	29-III-2009	PORTUGAL - Serra Candeeiros – PNSAC	ETA078
H23	<i>E. tagis castellana</i>	AV	21-III-2009	ESPAÑA - El Regajal, Aranjuez	ETA079
H21	<i>E. tagis castellana</i>	AV	21-III-2009	ESPAÑA - El Regajal, Aranjuez	ETA080
H21	<i>E. tagis castellana</i>	AV	21-III-2009	ESPAÑA - El Regajal, Aranjuez	ETA081
H5	<i>E. tagis castellana</i>	AV	21-III-2009	ESPAÑA - El Regajal, Aranjuez	ETA082
H24	<i>E. tagis castellana</i>	AV	21-III-2009	ESPAÑA - El Regajal, Aranjuez	ETA083
H5	<i>E. tagis</i>	Jorge Almeida	11-IV-2009	RU - Gibraltar	ETA084
H6	<i>E. tagis</i>	EM	12-IV-2009	RU - Gibraltar	ETA085
H5	<i>E. tagis</i>	Luís Ferreira	12-IV-2009	RU - Gibraltar	ETA086
H5	<i>E. tagis</i>	EM	12-IV-2009	RU - Gibraltar	ETA087
H5	<i>E. tagis</i>	EM	12-IV-2009	RU - Gibraltar	ETA088
H25	<i>E. tagis tagis</i>	EM	19-IV-2009	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ETA089
H32	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Cortegana, Huelva	ETA092
H32	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Cortegana, Huelva	ETA093
H9	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Fuenteheridos, Huelva	ETA094
H9	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Fuenteheridos, Huelva	ETA095
H8	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Alajar, Huelva	ETA096
H10	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Alajar, Huelva	ETA097
H9	<i>E. tagis alhajarae</i>	EM & IR	01-V-2009	ESPAÑA - Alajar, Huelva	ETA098
H21	<i>E. tagis</i>	RR	06-V-2009	ESPAÑA - Campino, Burgos	ETA099
H19	<i>E. tagis</i>	RR	06-V-2009	ESPAÑA - Campino, Burgos	ETA100
H12	<i>E. tagis</i>	RR	06-V-2009	ESPAÑA - Campino, Burgos	ETA101
H20	<i>E. tagis</i>	RR	06-V-2009	ESPAÑA - Campino, Burgos	ETA102
H2	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA103
H1	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA104
H3	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA105
H2	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA106
H1	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA107
H2	<i>E. tagis bellezina</i>	FG	22-IV-2009	FRANÇA - Gard, Languedoc	ETA108
	<i>Anthocharis cardamines</i>	EM & JPC	25-II-2009	PORTUGAL - Serra da Arrábida	ACA001

## ANEXO V

### Espécies do género *Iberis* (Cruciferae)

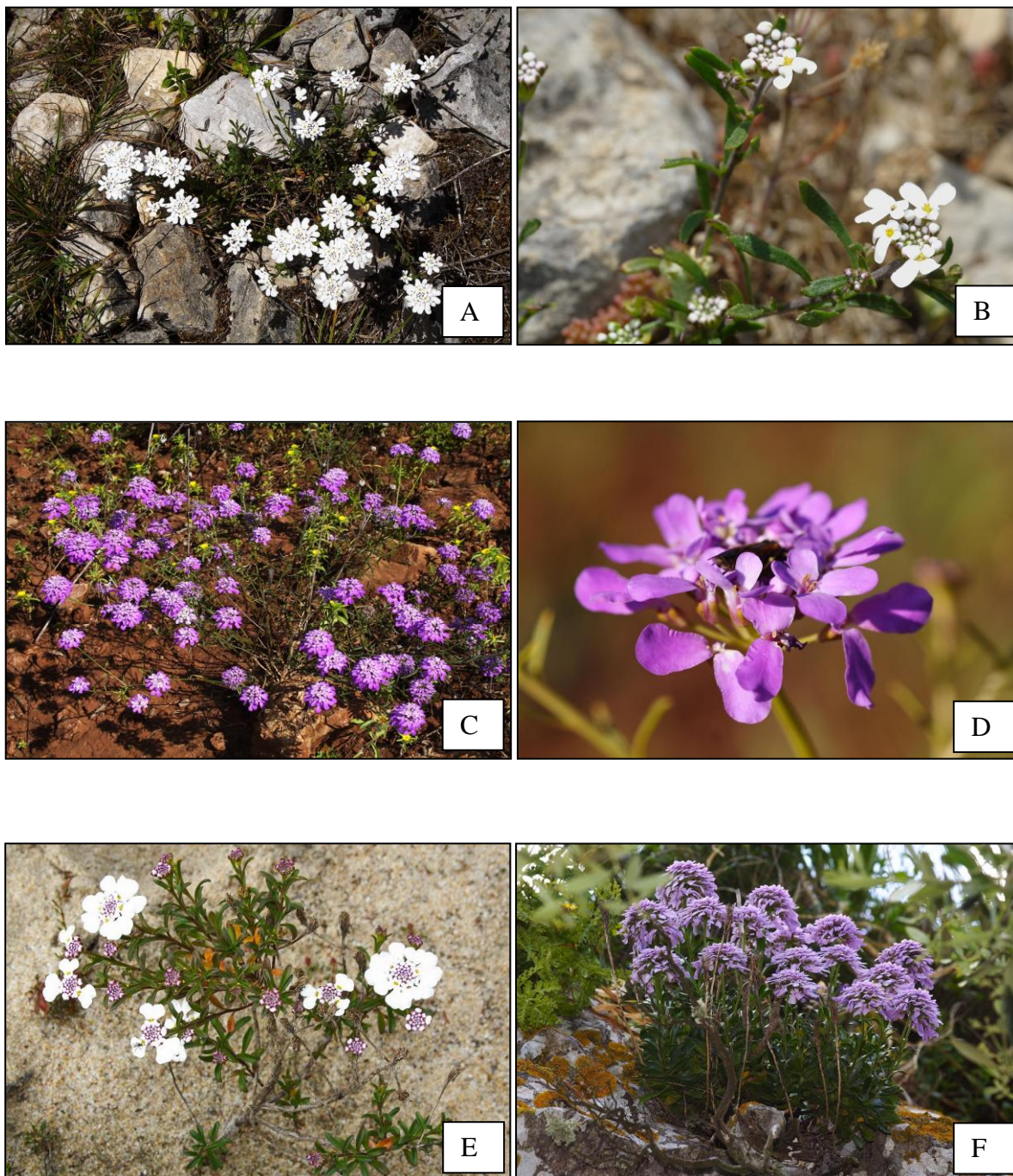


Figura 25: a) *Iberis procumbens microcarpa*; b) *I. p. microcarpa* (detalhe); c) *I. ciliata contracta*; d) *I. c. contracta* (detalhe do corimbo); e) *Iberis procumbens procumbens*; f) *Iberis gibraltarica*. (Fotos © Eduardo Marabuto).



## ANEXO VI

### Distribuição das espécies do género *Iberis* em Portugal

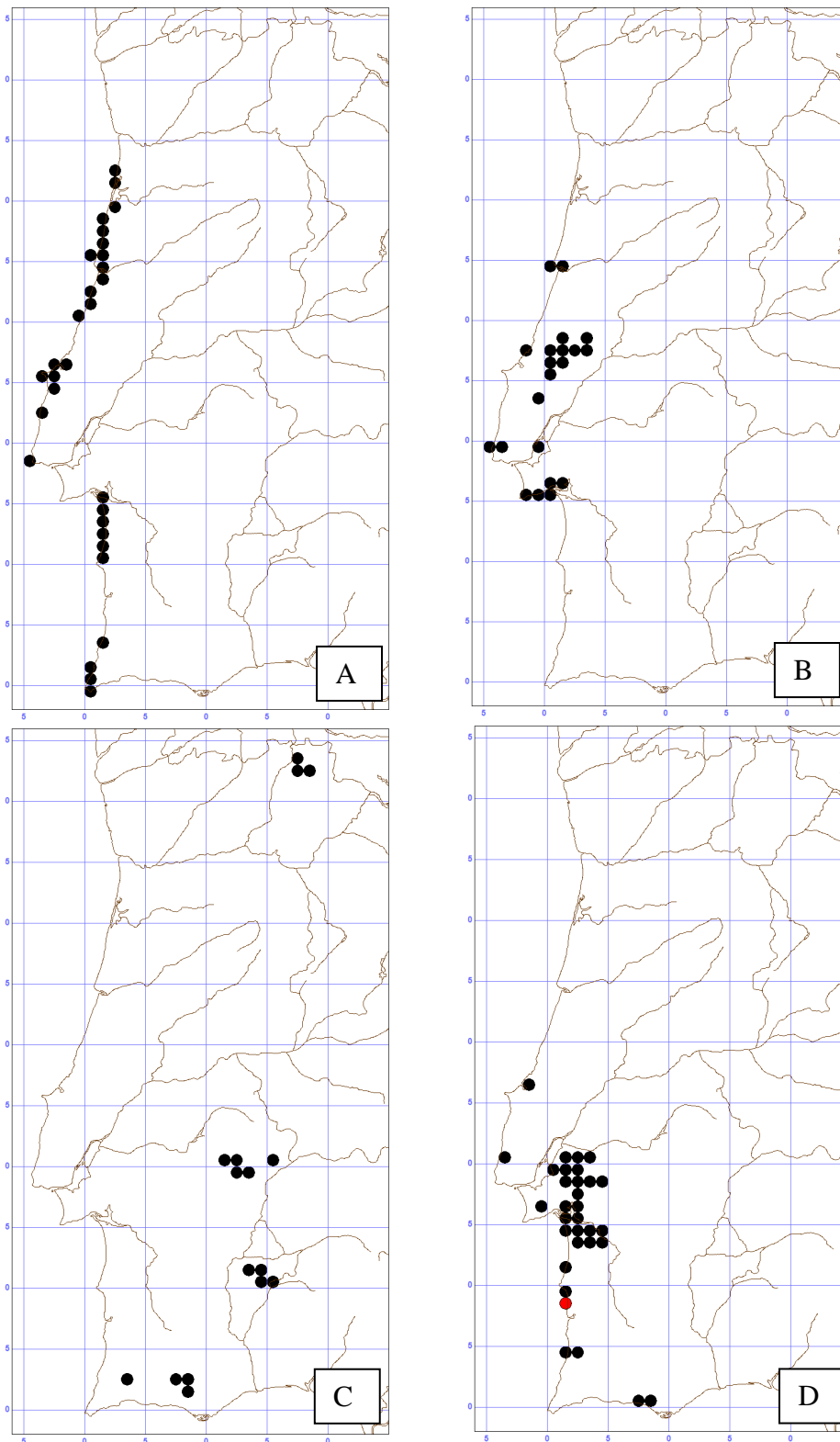


Figura 26: a) *Iberis procumbens procumbens*; b) *I. p. microcarpa*; c) *I. ciliata contracta*; d) *I. c. welwitschii* (preto) e *I. pectinata* (vermelho).

## ANEXO VII

### Habitats de *Euchloe tagis*

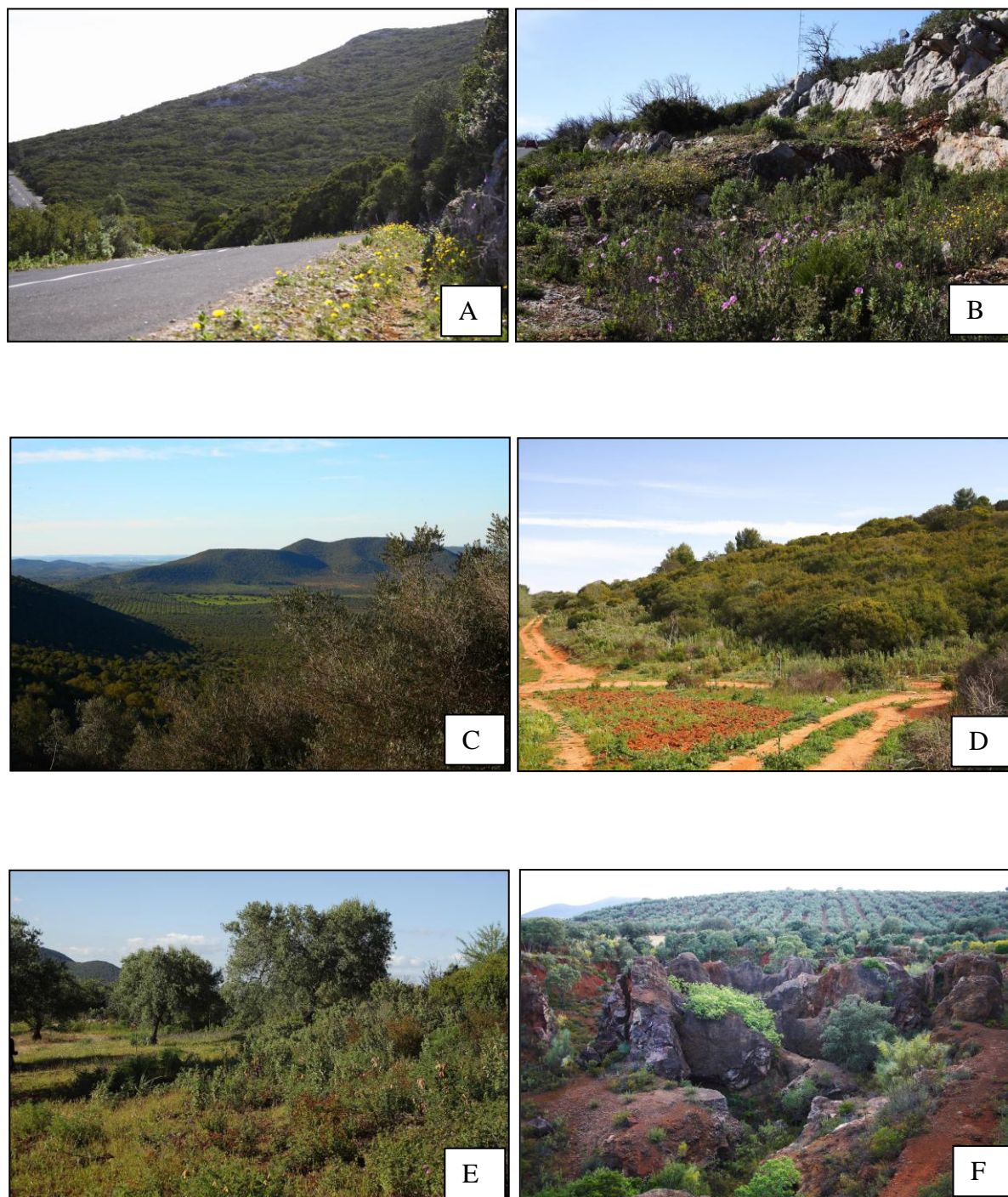


Figura 27: a) Serra da Arrábida; b) Serra da Arrábida (detalhe); c) Serra da Adiça; d) Serra da Adiça (pormenor); e) Serra da Adiça (interface olival / matagal); f) Serra da Adiça (pedreira abandonada). Fotos © Eduardo Marabuto.

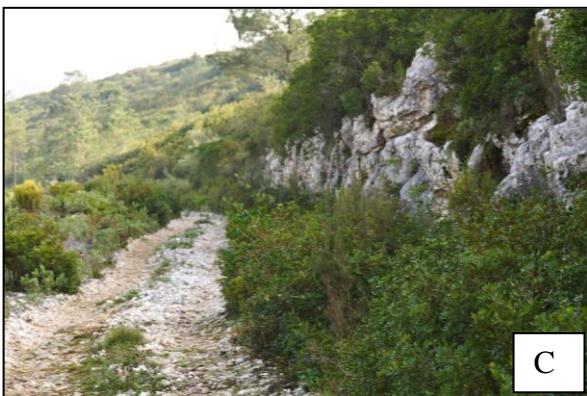


Figura 28: a) Anticlinal de Estremoz (zona de Sousel); b) Anticlinal de Estremoz (olival perto de Vila Viçosa); c) Serra dos Candeeiros (Porto de Mós); d) idem; e) Gibraltar; f) Gibraltar (Jews Gate). (Fotos © Eduardo Marabuto).

## ANEXO VIII

### Estádios imaturos de *Euchloe tagis*



Figura 29: a) Ovo em *I. procumbens microcarpa* (Serra da Arrábida); b) idem. Ovo da esquerda recém posto, da direita prestes a eclodir; c) Larva L1 em *I. ciliata contracta* (Serra da Adiça); d) idem; e) idem; f) Larva L2 idem. (Fotos © Eduardo Marabuto).

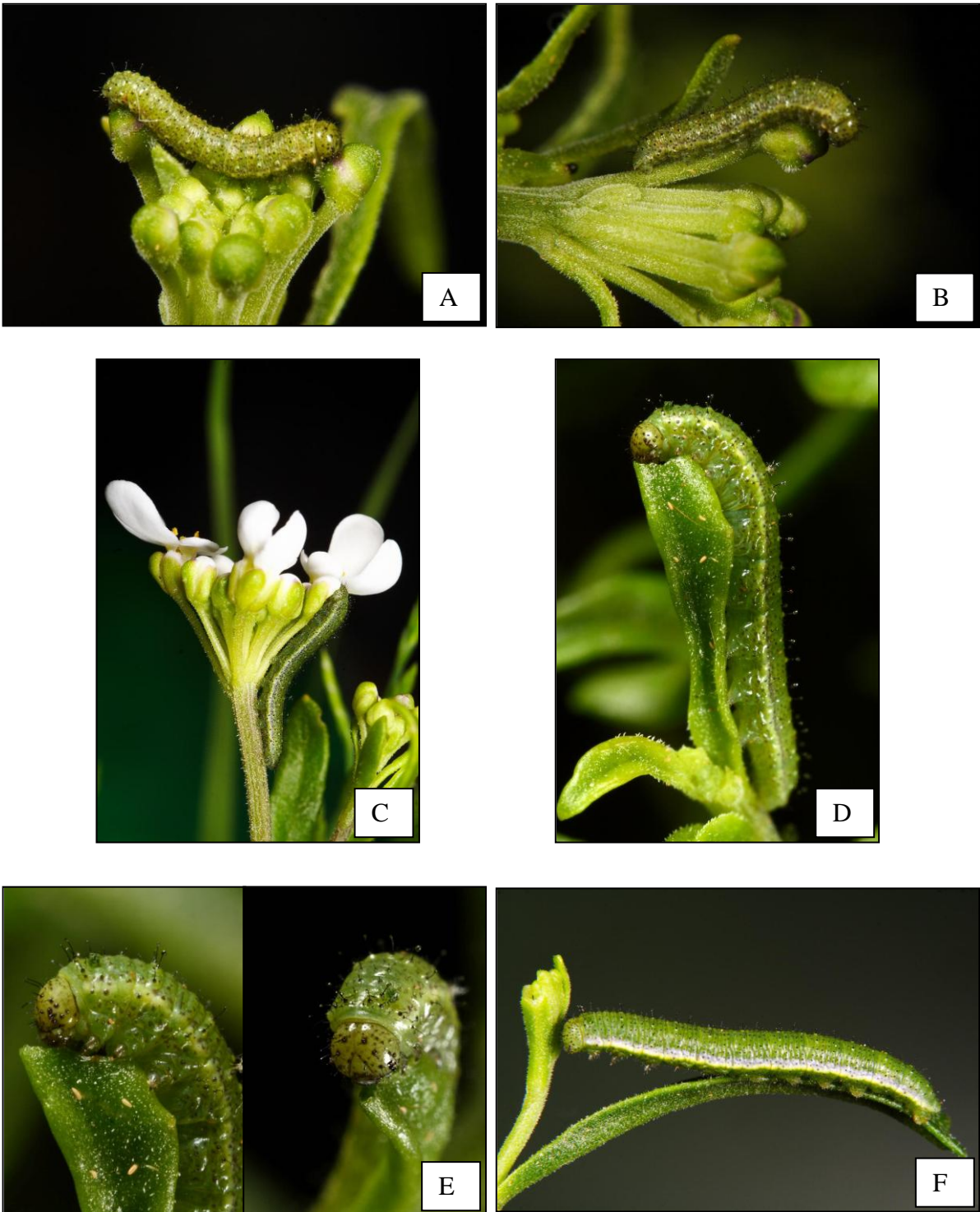


Figura 30: a) e b) Larva L3 em *I. ciliata contracta* (Serra da Adiça); c) Larva L3 em *I. procumbens microcarpa* (Serra Candeeiros); d) Larva L3 (Serra da Adiça); e) idem (detalhe); f) Larva L4. (Fotos © Eduardo Marabuto).



Figura 31: a)-f) Larva L5 em *I. ciliata contracta* (Serra da Adiça). (Fotos © Eduardo Marabuto).



Figura 32: a)-f) Larva L5 prestes a pupar; b) pré-pupa; c) ecdise; d) pupa recém-formada; e), f) pupa vista lateral e vista superior. (Fotos © Eduardo Marabuto).

## ANEXO IX

### Estado adulto de *Euchloe tagis*

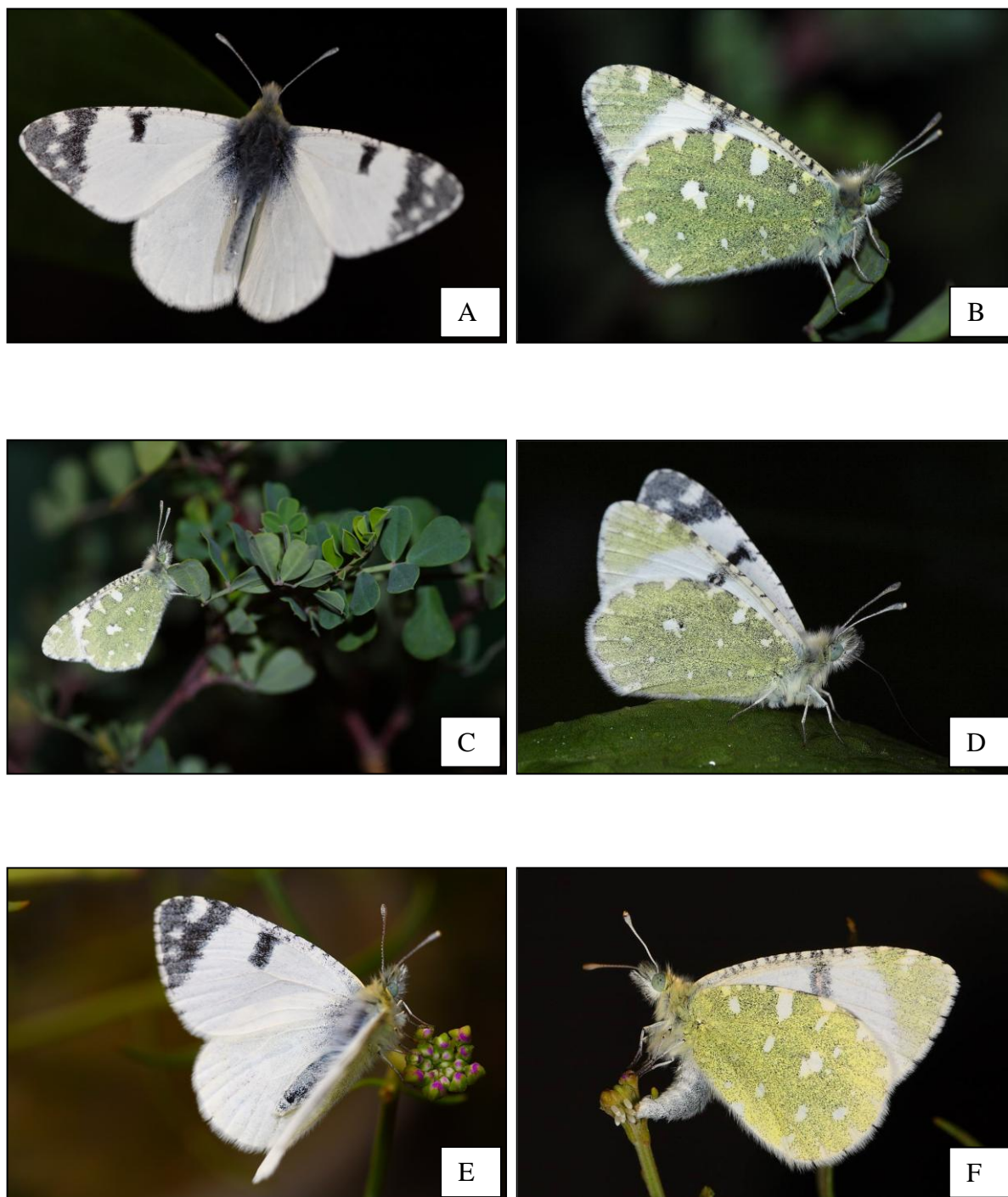


Figura 33: Imagos. a), b) & c) macho (Serra da Arrábida); d) Macho, pouco marcado. idem.; e) & f) fêmea a ovipositar (Anticlinal de Estremoz). (Fotos © Eduardo Marabuto).



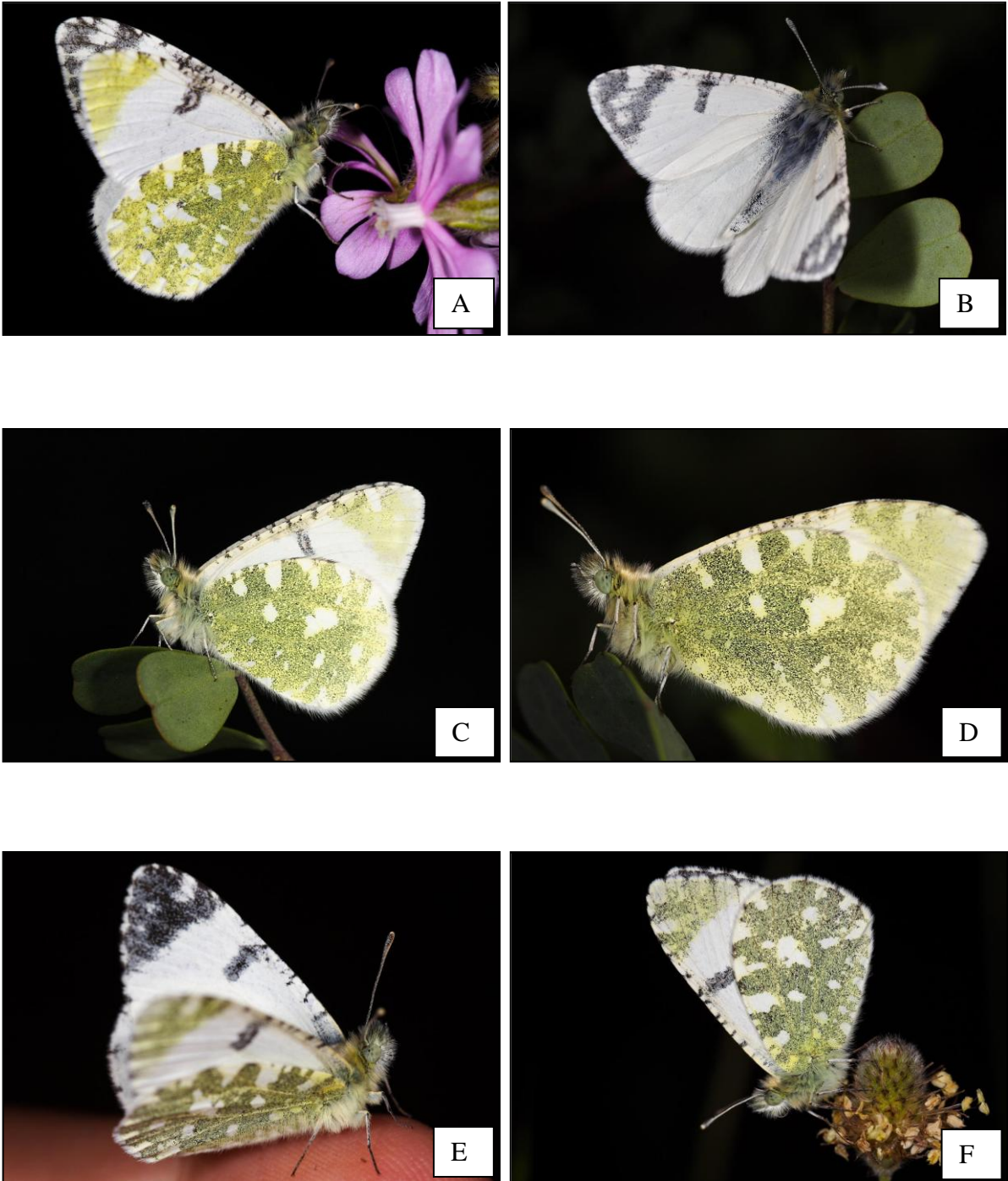


Figura 34: Imagos. a) macho (Serra dos Candeeiros); b) fêmea (Serra da Adiça); c) macho (Serra da Adiça); d) como b); e) macho (Gibraltar); f) idem.. (Fotos © Eduardo Marabuto)

## ANEXO X

### Estado adulto de *Euchloe tagis*: exemplares em coleção

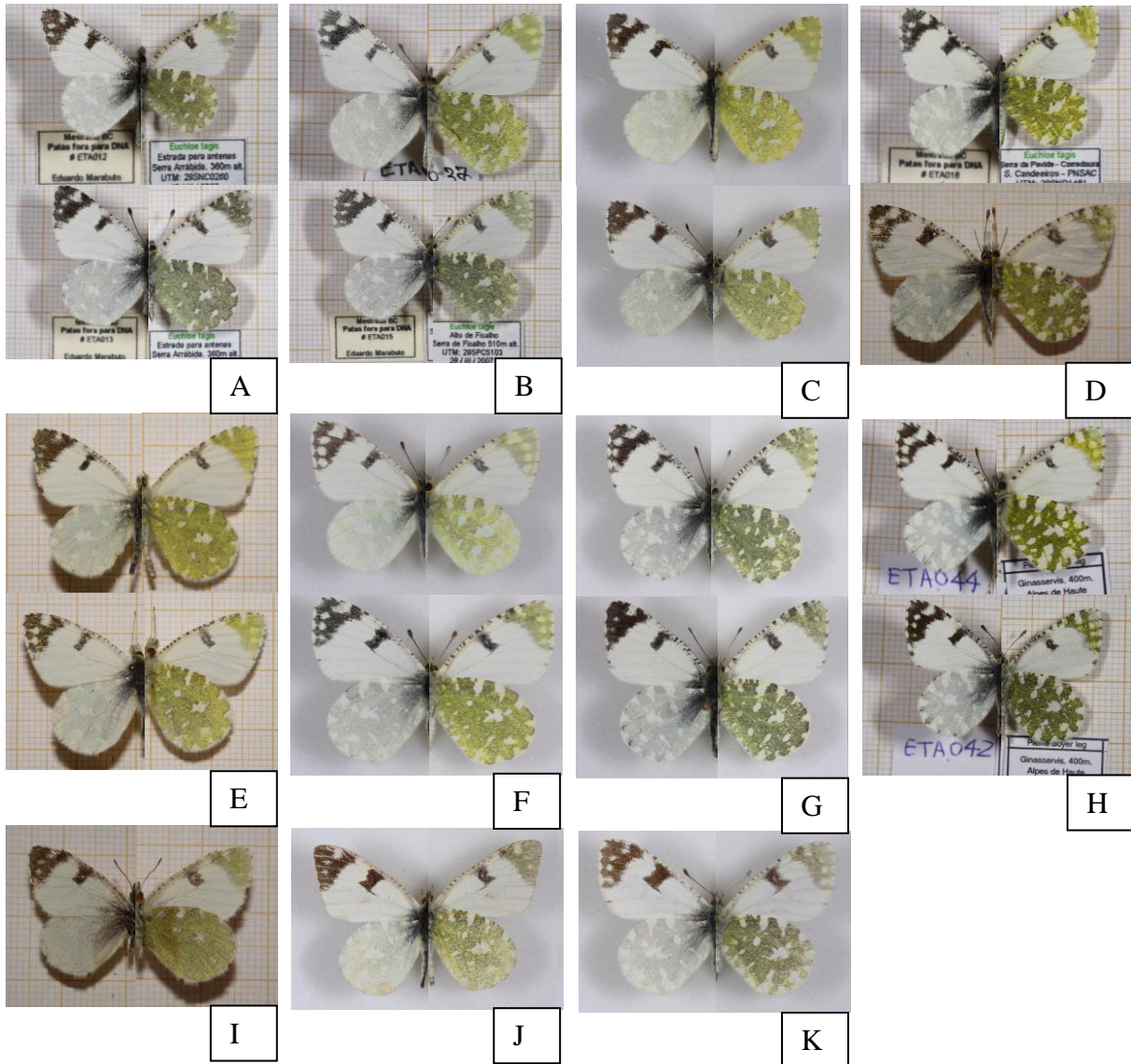


Figura 35: Imagos. a) macho e fêmea (Serra da Arrábida); b) macho e fêmea (Serra da Adiça); c) macho e fêmea (Anticlinal de Estremoz); d) macho e fêmea (Serra dos Candeeiros); e) 2 machos (Sierra Elvira (Granada, Espanha); f) macho e fêmea (Alajar, Huelva, Espanha); g) 2 machos (Gibraltar, UK); h) macho e fêmea (Provença, França); i) macho (Chefchaouen, Rif, Marrocos); j) macho, forma. (Anticlinal de Estremoz); k) fêmea (Serra da Arrábida).

## ANEXO XI

### Outras espécies



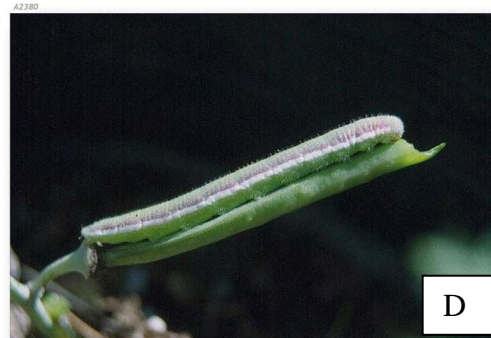
*Euchloe guaymasensis*, Rio Sonora Spring, Sonora, MX  
© 2005 Hank and Priscilla Brodtkin



*Euchloe guaymasensis* larva, Guaymas, SON, MX 30-I-03  
© 2005 Jim Brock



*Euchloe lotta*, Garden Cyn., Cochise County, AZ, USA 5-IV-05  
© 2005 Kim Davis & Mike Stangeland \* <http://www.kimandmikeontheroad.com/>



*Euchloe lotta* larva, Pima Co., Tucson, AZ, USA March 1993  
© 2005 Jim Brock



*Euchloe lotta* ♂ Coronado Peak, Cochise County, AZ, USA 5-IV-05  
© 2005 Kim Davis & Mike Stangeland \* <http://www.kimandmikeontheroad.com/>



© 2007 Kim Davis & Mike Stangeland \* <http://www.kimandmikeontheroad.com/>

Figura 36: Imagos de outras espécies aparentadas. a) imago *Euchloe guaymasensis*; b) lagarta L5 *E. guaymasensis*; c) imago *Euchloe lotta*; d) lagarta L5 *E. lotta*; e) imago *E. lotta*; f) *Euchloe hyantis*. Fotos © Warren, A. D., K. J. Davis, N. V. Grishin, J. P. Pelham, E. M. Stangeland. 2009. Interactive Listing of American Butterflies. [16-X-09] <http://www.butterfliesofamerica.com/>

## ANEXO XII

Quadro das posições parcimoniosamente informativas para a secção 5' do gene COI em *E. tagis*.

Haplótipo	Posição																											
	12	20	63	129	183	189	192	243	255	259	285	294	309	312	339	348	396	449	456	516	534	570	584	585	591	594		
H1	A	C	T	T	G	G	C	C	T	C	T	A	T	C	T	C	T	A	C	A	A	T	T	C	T	G		
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	-	C	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H5	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	T	C	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H6	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	T	C	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H7	-	-	C	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	T	C	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H8	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	A	T	C	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H9	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	A	T	C	T	G	-	-	-	C	-	-	T	-	-		
H10	-	-	-	C	-	A	-	-	-	T	-	-	A	T	-	T	G	-	-	-	C	-	-	-	-	-		
H11	-	-	-	C	-	A	-	-	-	T	-	-	A	T	-	T	G	-	-	-	C	-	A	-	-	-		
H12	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	T	C	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H13	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	-		
H14	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	-		
H15	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	G	-	-	A	-	-	-		
H16	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	G	G	C	-	-	-	-		
H17	G	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	G	G	C	-	-	-	-		
H18	G	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	-	C	T	G	-	T	-	C	N	-	-	-	W		
H19	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	-	-	-	-	-	-	-		
H20	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	C		
H21	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	-	-	-	-	-	-	C		
H22	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	-	-	-	-	-	-	C		
H23	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	C	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	C		
H24	-	-	-	-	-	A	-	T	C	T	C	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	C		
H25	-	-	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	C		
H26	-	-	-	-	A	A	T	T	C	T	-	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	C		
H27	-	T	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	C		
H28	-	-	-	-	-	A	T	-	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	C		
H29	-	-	-	-	-	T	T	T	C	T	-	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	C		
H30	-	-	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	-	-	-	-	-	C		
H31	-	-	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	G	-	-	-	-	C		
H32	-	-	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	G	T	G	-	-	-	-	-	C	A	
H33	-	T	-	-	-	A	T	T	C	T	-	-	-	T	C	T	G	G	T	G	-	-	-	-	-	C		
H34	-	-	-	-	-	A	T	-	C	T	-	-	-	T	C	T	G	-	T	G	G	-	-	-	-	C		

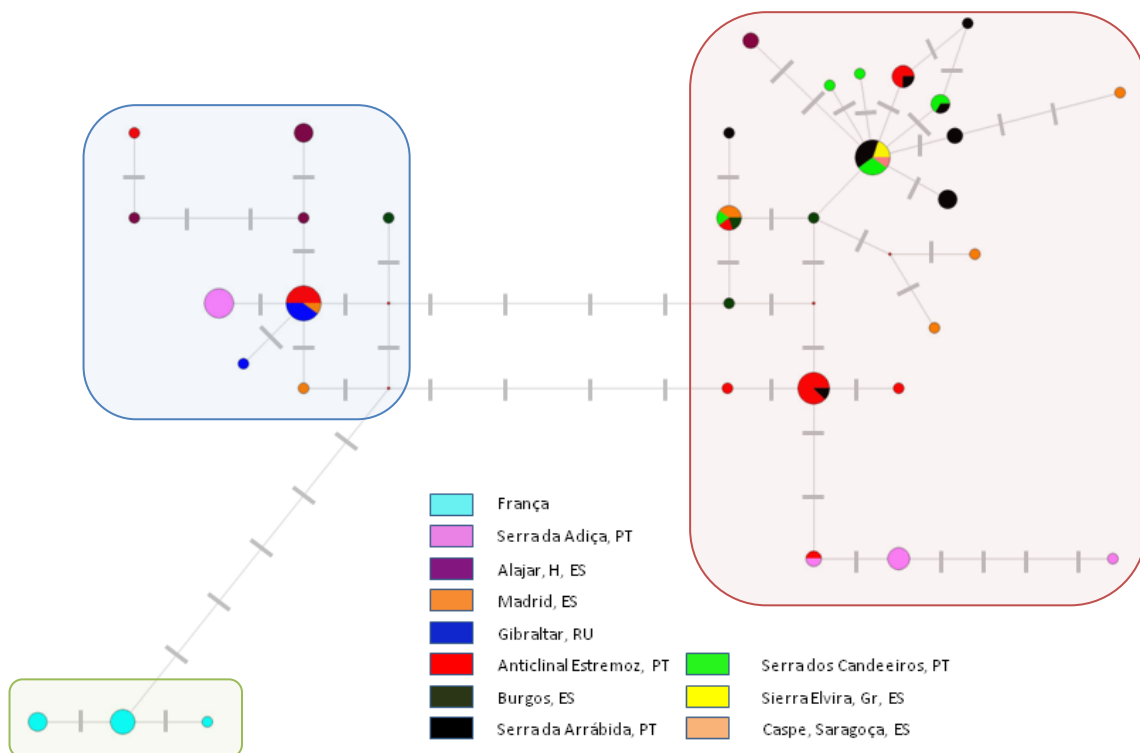


Figura 37: Rede de haplotipos formada pelo métodos de *Median Joining*. O diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho da amostra e os três polígonos que envolvem os três grupos de haplotipos são os *clades* considerados na interpretação; “*Clade bellezina*” a verde, “*Clade 1*” a azul e “*Clade 2*” a vermelho. Nos círculos, encontra-se discriminada a frequência de cada população no haplotipo em causa.

### ANEXO XIII

Matriz de distâncias não corrigidas (distância p) dos 34 haplotipos de *E. tagis* para o gene COI.

Haplótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33					
H1																																						
H2	0,002																																					
H3	0,010	0,012																																				
H4	0,010	0,012	0,012																																			
H5	0,012	0,014	0,014	0,002																																		
H6	0,014	0,015	0,015	0,003	0,002																																	
H7	0,014	0,015	0,015	0,003	0,002	0,003																																
H8	0,014	0,015	0,015	0,003	0,002	0,003	0,003																															
H9	0,014	0,015	0,015	0,003	0,002	0,003	0,003	0,000																														
H10	0,014	0,015	0,015	0,007	0,005	0,007	0,007	0,003	0,003																													
H11	0,014	0,015	0,015	0,007	0,005	0,007	0,007	0,003	0,003	0,000																												
H12	0,012	0,014	0,014	0,005	0,003	0,005	0,005	0,005	0,005	0,008	0,008																											
H13	0,015	0,017	0,017	0,008	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,010																										
H14	0,014	0,015	0,015	0,010	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,017	0,012	0,002																								
H15	0,014	0,015	0,015	0,010	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,012	0,002	0,000	0,000																							
H16	0,017	0,019	0,019	0,012	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,015	0,005	0,003	0,003	0,002																						
H17	0,019	0,020	0,020	0,014	0,015	0,017	0,017	0,017	0,017	0,020	0,020	0,017	0,007	0,005	0,005	0,002	0,002																					
H18	0,020	0,022	0,022	0,010	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,015	0,008	0,010	0,010	0,008	0,007	0,007																				
H19	0,014	0,015	0,015	0,010	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,014	0,014	0,008	0,005	0,003	0,003	0,003	0,007	0,008	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	
H20	0,015	0,017	0,017	0,012	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,010	0,003	0,002	0,002	0,002	0,005	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	
H21	0,014	0,015	0,015	0,010	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,014	0,014	0,008	0,005	0,003	0,003	0,003	0,007	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H22	0,015	0,017	0,017	0,012	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,010	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H23	0,017	0,019	0,019	0,014	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,012	0,005	0,003	0,003	0,003	0,007	0,008	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	
H24	0,019	0,020	0,020	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H25	0,017	0,019	0,019	0,014	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,012	0,005	0,003	0,003	0,003	0,007	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H26	0,019	0,020	0,020	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H27	0,019	0,020	0,020	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H28	0,015	0,017	0,017	0,012	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,010	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H29	0,015	0,017	0,017	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H30	0,019	0,020	0,020	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,019	0,019	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H31	0,019	0,020	0,020	0,014	0,012	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H32	0,020	0,022	0,022	0,017	0,015	0,017	0,017	0,017	0,017	0,020	0,020	0,015	0,008	0,007	0,007	0,007	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H33	0,022	0,024	0,024	0,019	0,017	0,019	0,019	0,019	0,019	0,022	0,022	0,017	0,010	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
H34	0,017	0,019	0,019	0,012	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,012	0,008	0,007	0,007	0,007	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	

The Road goes ever on and on  
Down from the door where it began.  
Now far ahead the Road has gone,  
And I must follow, if I can,  
Pursuing it with eager feet,  
Until it joins some larger way  
Where many paths and errands meet.  
And whither then? I cannot say.

*J. R. R. Tolkien – The Lord of the Rings*