

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Renê Alvarez Rocha

**“Variabilidade genética em populações de *Utetheisa
ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Renê Alvarez Rocha

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Solferini

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ecologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R582v

Rocha, René Alvarez
Variabilidade genética em populações de *Utetheisa ornatix* (Lepidoptera: Arctiidae) / René Alvarez Rocha. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Vera Nisaka Solferini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Utetheisa ornatix*. 2. Endogamia. 3. Fluxo genético. 4. Microssatélites (Genética). 5. Estruturação genética. I. Solferini, Vera Nisaka. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Genetic variability in populations of *Utetheisa ornatix* (Lepidoptera: Arctiidae).

Palavras-chave em inglês: *Utetheisa ornatix*; Inbreeding; Gene flow; Microsatellites (Genetics); Genetic structure.

Titulação: Mestrado em Ecologia.

Banca examinadora: Vera Nisaka Solferini, Louis Bernard Klaczko, Evandro Marsola de Moraes.

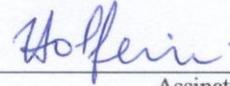
Data da defesa: 02/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Ecologia.

Campinas, 02 de fevereiro de 2011

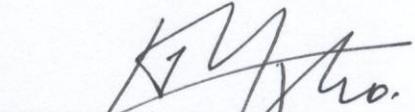
BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vera Nisaka Solferini
(Orientadora)



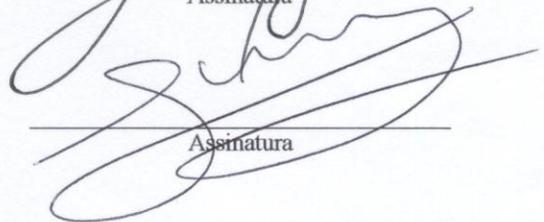
Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Assinatura

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes



Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

Assinatura

Prof^a. Dr^a. Rosana Tidon

Assinatura

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia – Unicamp.

A CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Prof. José Roberto Trigo pelas sugestões, ajuda e críticas construtivas.

Aos membros da banca Prof. Louis Bernard Klaczko, Prof. Evandro Marsola de Moraes e Profa. Vera Nisaka Solferini.

À Profa. Vera Nisaka Solferini pela orientação desde minha iniciação científica.

Aos amigos Carlos Henrique, Martin, JJ e Chico pela ajuda com as coletas.

Ao Renato por ter me ensinado praticamente todos os procedimentos de laboratório que usei ao longo da iniciação científica e mestrado, além de todas as conversas que tivemos sobre futebol.

A Célia por toda a ajuda e disposição todos os dias no laboratório.

A Elen pela companhia e boemia desde 2007.

A todo o pessoal do LDG por tornar o dia a dia de laboratório algo divertido.

Aos grandes amigos Victor e Tiago pelas terças-feiras despretensiosas e discussões sobre a vida, o universo e tudo mais.

Aos amigos de APF por não dominarem os fundamentos básicos do futebol e por todas as brincadeiras de mau gosto.

Aos amigos do 04 por todas as boas lembranças.

A Maria Letícia pelas conversas de todos os tipos e ser amiga pra todas as horas.

A Maria Lígia pelo apoio nos momentos tensos, puxões de orelha nos momentos certos, pelo carinho e por me apresentar Minas Gerais.

A minha família por todo o apoio, aprendizagem e me suportarem desde sempre.

Índice

Resumo	01
Abstract	03
1. Introdução	05
1.1. Estrutura Genética	05
1.2. Uso de microssatélites em genética de populações	06
1.3. Espécie estudada: <i>Utetheisa ornatix</i>	07
2. Objetivos	12
3. Material e Métodos	13
3.1. Locais de coleta	13
3.2. Extração de DNA	15
3.3. Amplificação de DNA	16
3.4. Determinação do tamanho dos fragmentos	18
3.5. Análise dos Resultados	18
4. Resultados	20
4.1. Loci utilizados	20
4.2. Diversidade genética dentro das populações	20
4.3. Fluxo gênico	24
4.4. Alelos nulos	24
4.5. Diferenciação entre populações	26
4.6. Correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas	28
5. Discussão	30
6. Conclusões e Perspectivas	37
Referências Bibliográficas	39

Resumo

A estrutura genética de uma espécie é determinada pelo balanço entre deriva genética, fluxo gênico e seleção natural, que são processos fortemente influenciados pela demografia e distribuição espacial das populações. *Utetheisa ornatix* é uma mariposa da família Arctiidae muito conhecida por seus mecanismos de defesa e sistema de acasalamento, mas a estrutura genética de suas populações é pouco estudada. Este trabalho investigou a estrutura genética de *Utetheisa ornatix* de populações coletadas no Estado de São Paulo com base em três locos de DNA de microssatélite. Foram analisados os genótipos de 203 indivíduos de 10 populações. Os resultados encontrados mostram populações com grande deficiência de heterozigotos, baixa estruturação genética e ausência de correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas. Tais resultados indicam que mesmo sendo uma espécie cuja fêmea apresenta comportamento promíscuo, essa promiscuidade não reflete em diminuição da endogamia. Possivelmente a deficiência de heterozigotos se deve ao fato da fêmea não evitar acasalamento com machos aparentados, ser fecundada pelo esperma de poucos machos e haver forte seleção sexual na espécie, o que pode formar subgrupos dentro de uma população. A deficiência de heterozigotos também pode ser devido à dinâmica populacional da espécie: populações estão sujeitas à constantes diminuições de populações e fluxo gênico, o que pode resultar em populações formadas por subgrupos de indivíduos oriundos de diferentes manchas de plantas-hospedeiras, logo a frequência de heterozigotos não corresponde as frequências alélicas encontradas. A baixa estruturação genética e ausência de correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas indicam que *U. ornatix* é uma espécie com alta capacidade de dispersão, o que é conflitante com a elevada endogamia encontrada. Os resultados revelam questões que podem ser respondidas em

trabalhos posteriores que estudem a dinâmica populacional e a variabilidade genética de cada população ao longo do tempo. Outra questão levantada é se a espécie hospedeira de *Crotalaria* em que o indivíduo nasce influencia na escolha de parceiros para acasalamento, visto que duas das três populações que mais contribuíram para o nível de estrutura genética encontrado estavam em locais onde haviam espécies diferentes de planta hospedeira.

Palavras-chave: *Utetheisa ornatix*, estrutura genética, endogamia, fluxo gênico, microssatélites.

Abstract

The genetic structure of a species is determined by the balance between genetic drift, gene flow and natural selection processes that are strongly influenced by demography and spatial distribution of population. *Utetheisa ornatix* is a moth of the Arctiidae family well known for their defense mechanisms and mating system, but the genetic structure of their populations is little studied. This study investigated the genetic structure of *Utetheisa ornatix* populations collected in the State of São Paulo, Brazil, based on three microsatellite loci. We analyzed the genotypes of 203 individuals from 10 populations. The results show populations with high inbreeding, low genetic structure and no correlation between geographic distance and genetic differences. These results indicate that even as a species whose female has promiscuous behavior, promiscuity does not reduce inbreeding. Possibly the heterozygote deficiency is due to the fact that females did not avoid mating with related males, are fertilized by sperm from few males, and sexual selection is very strong in this species, which can form subgroups within a population. The heterozygote deficiency may also be due to its population dynamics: populations are subject to constant reductions and gene flow, which can result in populations composed of subgroups of individuals from different patches of host plants, so the frequency of heterozygotes does not match the allele frequencies found. The low genetic structure and lack of correlation between geographic distance and genetic differences indicate that *U. ornatix* is a species with high dispersal ability, which is conflicting with the high inbreeding found. The results show questions that can be answered in further studies to examine the population dynamics and genetic variability of each population over time. Another question is if the host species of *Crotalaria* in which the individual was born influences the choice of mating partners, because two of the three

populations that most contributed to the level of genetic structure were found in locals with presence of different species of host plant.

Keywords: *Utetheisa ornatix*, genetic structure, inbreeding, gene flow, microsatellites.

1. Introdução

1.1. Estrutura genética

A estrutura genética de uma espécie é determinada pelo balanço entre deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Wright 1943, Hedrick 2005). Esses processos são fortemente influenciados pela demografia e distribuição espacial das populações. O tamanho populacional e suas flutuações através do tempo determinam a taxa em que a variabilidade genética local é perdida por deriva genética. A distância e conectividade entre populações vizinhas e seus tamanhos influenciam o quanto essa perda de variabilidade local devido à deriva genética irá ser repostada por fluxo gênico. Já a seleção natural influencia a distribuição da variação genética dentro e entre populações de acordo com as variações de adaptação de alelos variantes em diferentes regiões (Wright 1931; Hedrick 2005).

A deriva genética é mais pronunciada quanto menor o tamanho efetivo da população, pois a probabilidade de um alelo ser perdido ou fixado durante a flutuação aleatória nas frequências gênicas é maior. A ação da deriva genética diminui a variabilidade genética local e aumenta as diferenças genéticas entre as populações (Hartl & Clark 1997).

A diferenciação genética local ocasionada por deriva genética e seleção local pode ser exacerbada ou diminuída pela maneira como ocorre o fluxo gênico entre as populações (Wright 1931). Fluxo gênico é uma força microevolutiva que pode determinar o potencial para diferenciação genética entre populações devido a adaptações locais, também influenciando a difusão geográfica de novas adaptações. Os níveis de fluxo gênico em populações naturais e seu papel na evolução tem sido historicamente matéria de debate (Fisher 1930; Mayr 1942; Ehrlich

& Raven 1969; Wright 1977).

Populações que se mantêm em ambientes estáveis e conectadas por dispersão por longos períodos de tempo chegam a um equilíbrio genético que recupera a perda de alelos devido à deriva genética com a introdução de novos alelos que chegam por migração (Wright 1951). Mesmo se a chegada de migrantes for extremamente baixa ela pode acabar evitando a diferenciação das populações por deriva genética (Slatkin 1995).

A chave para entender o quanto o fluxo gênico irá impedir a diferenciação local de uma espécie é entender não apenas a quantidade de fluxo gênico que ocorre tipicamente entre populações naturais, mas também os fatores que governam o fluxo gênico. Diversos fatores ambientais podem promover isolamento de populações, como distância geográfica, barreiras físicas para o fluxo gênico (como um rio ou montanhas e vales), disponibilidade de habitat (ou plantas-hospedeiras) e/ou fragmentação deste. Além dos fatores ambientais, características ecológicas e da história de vida da espécie (capacidade de dispersão, estágios de vida próprios para dispersão, tempo de vida, adaptabilidade a novos ambientes) podem ser de grande importância para moldar a distribuição da diversidade genética da espécie (Peterson & Denno, 1998). Por exemplo, muitos insetos fitófagos são geograficamente estruturados, apresentando adaptações locais e fidelidade a planta-hospedeira que geram um isolamento genético entre populações (Dres & Mallet, 2002).

1.2. Uso de microssatélites em genética de populações

Microssatélites são pequenas seqüências repetidas de DNA encontradas no genoma de diversos organismos, incluindo insetos (Haymer 1994, Valdes *et al* 1993, Queller *et al* 1993).

Apesar de estudos sugerirem que pelo menos uma fração de microssatélites tenham funções importantes (Li *et al.* 2002), eles são considerados marcadores moleculares neutros altamente variáveis, e por essa razão o tipo de marcador molecular mais frequentemente utilizado em estudos de genética de populações (Meglecz *et al* 2007).

Por serem marcadores moleculares neutros e altamente variáveis, microssatélites são ideais para estudar variação intraespecífica, mesmo podendo apresentar elevados níveis de alelos nulos em Lepidoptera (Meglecz & Solignac 1998; Keyghobadi *et al.* 1999). Alelo nulo é um alelo que não conseguimos amplificar, dessa forma ele não irá aparecer no gel de acrilamida. Um indivíduo heterozigoto que possua um alelo nulo irá ter apenas seu outro alelo amplificado, o que faz com que ele seja classificado como homozigoto, ou seja, ele é um “falso homozigoto”. Já um indivíduo que seja homozigoto por possuir duas cópias deste alelo nulo será confundido com um indivíduo que não teve seus alelos amplificados com sucesso.

O viés de alelos nulos pode ser contornado com alguns cuidados nas análises dos resultados, através da estimativa das frequências de todos os alelos considerando a presença de alelos nulos, o que permite que microssatélites sejam muito utilizados em estudos de genética de população neste grupo (Williams *et al* 2003, Keyghobadi *et al* 2005, Meglecz *et al* 2007, Orsini *et al* 2008, Sigaard *et al* 2008).

1.3. Espécie estudada: *Utetheisa ornatix*

O conhecimento do grupo Lepidoptera excede a maioria do de outros grupos de invertebrados. Existem informações sobre preferências de habitat e plantas-hospedeiras, mapas de distribuição de espécies e registros de mudanças de abundância destas. Por essa razão,

borboletas e mariposas têm sido muito utilizadas como modelos para examinar dinâmicas populacionais e genéticas em ambientes perturbados e/ou fragmentados (Hanski *et al.* 1994; Hill *et al.* 1996; Saccheri *et al.* 1998, Collier *et al.* 2010).

Utetheisa ornatrix é uma mariposa da família Arctiidae, subfamília Arctiinae, tribo Callimorphini (Weller *et al.* 1999). Essa espécie tem sido objeto de inúmeros estudos em ecologia química, como o seqüestro de alcalóides pirrolizidínicos (APs) usado como defesa contra predadores e precursores de feromônios sexuais em machos (ver revisão Trigo 2010). Entretanto a estrutura genética de suas populações é pouco estudada. *Utetheisa ornatrix* é encontrada em áreas abertas esporadicamente no sul dos Estados Unidos e no México, por toda a América Central e grande parte da América do Sul (Bezzerides 2004). *Utetheisa ornatrix* depende de APs para completar o seu ciclo de vida (Eisner & Meinwald 1995). Esses alcalóides são obtidos durante o estágio larval de ambos os sexos, ao se alimentar de folhas e sementes de plantas do gênero *Crotalaria*, sendo mantidos ao longo de toda a vida do indivíduo (Eisner & Meinwald 1995, Eisner *et al.* 2000, Ferro *et al.* 2006).

Os ovos de *U. ornatrix* também estão protegidos por APs, que são recebidos tanto das fêmeas, quanto dos machos com quem a fêmea copulou (Dussourd *et al.* 1988). Esses alcalóides são eficientes mecanismos de defesa durante a fase larval e adulta contra predação por aranhas (Eisner & Eisner 1991). Devido a esses alcalóides os ovos são protegidos contra formigas (Hare & Eisner 1993), besouros coccinelídeos (Dussourd *et al.* 1988) e larvas de Chrysopídeos (Eisner *et al.* 2000).

Muitos trabalhos utilizam *U. ornatrix* como organismo modelo para estudos de seleção sexual devido à complexidade das estratégias reprodutivas de ambos os sexos. As fêmeas de *U. ornatrix* são poliândricas, copulando de quatro a 11 vezes na natureza e até 23 vezes em

laboratório, durante suas 4 ou 5 semanas de vida adulta (Pease 1968; LaMunyon 1994; LaMunyon 1997; Bezzerides & Eisner 2002).

Machos copulam sempre que há a oportunidade, podendo copular por 10 noites consecutivas (Sarver 2002). Fêmeas acasalam durante toda sua vida adulta e, quanto mais velhas, mais acasalamentos elas têm (Bezzerides 2004). Estudos em laboratório mostraram que fêmeas que não acasalam são mais longevas que fêmeas que acasalaram ao menos uma vez, sugerindo um gasto energético da produção de ovos (Bezzerides *et al* 2008).

Os machos passam “um presente nupcial” durante a cópula: espermátóforo contém, além de esperma, APs e nutrientes (LaMunyon & Eisner 1994, Rossini *et al* 2001). Estes alcalóides recebidos dos machos são utilizados pelas fêmeas para proteger seus ovos quimicamente e repor suas reservas (González *et al* 1999). É importante salientar que fêmeas podem utilizar APs doados por diferentes machos para proteger a prole de um macho diferente (Bezzerides & Eisner 2002).

Aparentemente os nutrientes recebidos dos machos também possibilitam que a fêmea aumente sua produção de ovos, com um aumento de fecundidade de 15% para cada cópula realizada (desde que os machos sejam virgens) (LaMunyon 1997). Este aumento deve estar relacionado à quantidade de nutrientes que a fêmea recebe por cópula, visto que em uma única cópula ela obtém todo o esperma que precisa para fecundar seus ovos (Bezzerides *et al* 2008).

Estudos mais recentes contradizem este aumento de fecundidade, pois mostram que o número de machos com quem a fêmea acasala e se estes são ou não aparentados dela não interferem na produção de ovos. A explicação para a contradição entre estes estudos pode estar na maneira como os experimentos recentes foram feitos: os machos apresentados para as fêmeas haviam copulado há duas noites, logo, seus espermátóforos eram pequenos e tinham menos

nutrientes (Bezzerides *et al* 2008). Machos precisam de seis a sete dias entre cópulas para passar espermátóforos de tamanho máximo durante a próxima cópula (LaMunyon & Eisner 1994). O macho pode passar, em média, o equivalente a 10% de sua massa corpórea para a fêmea (pelo menos nos acasalamentos iniciais) (LaMunyon 1997).

Fêmeas de *U. ornatix* preferem machos maiores para acasalar, e com isso conseguem benefícios diretos e indiretos. Com machos maiores, a fêmea garante mais APs para proteger a si mesmo e a seus ovos de predadores (benefício direto; Dussourd *et al.* 1988; González *et al.* 1999), consegue mais nutrientes aumentando sua fecundidade (benefício direto; LaMunyon 1997), e genes que determinam maior tamanho corporal (benefício indireto; Iyengar & Eisner 1999a). O tamanho corporal é herdável, logo, fêmeas que acasalam com machos maiores terão filhos grandes, que terão mais sucesso na coorte e filhas grandes que poderão ovipor mais (Iyengar & Eisner 1999b).

A seleção sexual em *U. ornatix* é tanto pré- como pós-copulatória. As fêmeas utilizam indicativos de altos níveis de APs nos machos para selecionar com quem irá copular (Dussourd 1991). Um indicativo da quantidade de APs é a produção e liberação de feromônios pelos machos (Conner *et al.* 1981; Iyengar *et al.* 2001). Os machos utilizam parte dos APs obtidos durante sua fase larval para produzir um feromônio de coorte, hidroxidanaidal (HD). Quando encontra uma fêmea (que produz um feromônio de longo alcance que não envolve APs, Conner *et al* 1980), o macho libera seu feromônio HD a partir da coremata, duas estruturas evertidas durante as interações pré-cópula (Conner *et al* 1981). Estudos feitos em laboratório demonstraram que a quantidade de HD dos machos é correlacionada com sua massa corpórea, massa de espermátóforo, APs transferidos para espermátóforo e quantidade de APs sistêmicos (Conner *et al.* 1990; Dussourd *et al.* 1991). Além da quantidade de APs, aparentemente a

experiência dos machos também pode ser importante para o sucesso em conseguir uma cópula. Experimentos em laboratório mostraram que machos que já haviam copulado duas vezes eram preferidos por fêmeas em relação a machos virgens (Iyengar 2009).

A seleção pós-copulatória se dá pelo tamanho dos espermatozoides dos machos, pois as fêmeas selecionam espermatozoides maiores para fecundar seus ovos (LaMunyon & Eisner 1993 e 1994). A seleção de machos maiores utilizando como critério o tamanho do espermatozoide pode “enganar” a fêmea. O tamanho do espermatozoide é proporcional ao tamanho do macho, mas após uma cópula uma espermateca de tamanho máximo só é produzida após seis ou sete dias, sendo assim, machos virgens menores podem ganhar a competição com machos maiores caso estes tenham copulado poucos dias atrás. Geralmente, um macho é pai de toda a prole ou de nenhuma parte dela, tanto em experimentos de laboratório quanto em pares que foram coletados no campo copulando (LaMunyon, 1994; LaMunyon & Eisner, 1993). Essa característica da reprodução de *U. ornatrix* pode ocasionar elevada endogamia na prole de uma fêmea, pois mesmo copulando com muitos machos, ela pode acabar utilizando apenas o espermatozoide de um macho aparentado para fecundar seus óvulos.

O controle realizado pela fêmea sobre o espermatozoide que irá utilizar para fecundar seus ovos é feito muscularmente em dois órgãos de seu trato reprodutivo: a espermateca e a pseudobursa (LaMunyon & Eisner 1993; Curril & LaMunyon 2006). Fêmeas de *U. ornatrix* armazenam menos espermatozoides do que recebem em suas múltiplas cópulas, principalmente quando a cópula foi com machos menores. Ainda segundo Curril & LaMunyon (2006), o espermatozoide rejeitado pode ser digerido na pseudobursa ou expelido da espermateca.

As fêmeas de *U. ornatrix* aparentemente não conseguem distinguir machos aparentados de não aparentados (Bezzerrides 2004) e também não distinguem machos com quem já acasalou

de machos com quem ainda não acasalou (Bezzerrides *et al* 2008). Essas características ajudam a explicar a endogamia encontrada por Bezzerrides *et al* (2004) no primeiro trabalho que tratou de estrutura genética da espécie, em populações da Flórida, EUA. O fato de não conseguir distinguir entre machos aparentados de não aparentados pode ser mais um motivo que explica a poliandria da espécie, pois ao acasalar diversas vezes as fêmeas garantem que pelo menos algum de seus parceiros não seja seu parente e tenha um espermatozoide compatível, evitando homozigose de alelos recessivos e prejudiciais.

Apesar de *U. ornatrix* ter seu sistema de acasalamento muito estudado, poucos estudos foram feitos com a finalidade de elucidar seus efeitos na variabilidade genética da espécie. Tendo em mente essa ausência de informação, o presente trabalho teve por objetivo conseguir informações sobre a variabilidade genética de populações de *U. ornatrix* no Estado de São Paulo.

2. Objetivos

1. Determinar a estrutura genética em *U. ornatrix* no Estado de São Paulo e os processos responsáveis por essa estrutura.
2. Testar se há correlação entre distâncias geográficas e diferenças genéticas entre as populações

3. Material e Métodos

3.1. Locais de coleta

Para determinar a estrutura genética de *Utetheisa oratrix* foram coletadas 10 populações da espécie no Estado de São Paulo (Figura 1). As coletas foram realizadas em dias sem chuva nos meses de fevereiro e março de 2008 e 2009 (Tabela I). As populações Campinas I, Mogi Guaçu, Pirassununga, Jardinópolis e Porto Feliz foram coletadas durante a manhã (9-11h), as populações Campinas II, Rincão e Rafard durante a tarde (15-17h), a população Águas de Lindóia foi coletada no final da tarde (após 16:30h até escurecer), e a população Picinguaba foi coletada ao longo do dia.



Figura 1. Mapa dos locais de coleta das 10 populações de *Utetheisa oratrix*. 1 = Jardinópolis, 2 = Rincão, 3 = Pirassununga, 4 = Mogi Guaçu, 5 = Águas de Lindóia, 6 = Campinas II, 7 = Campinas I, 8 = Rafard, 9 = Porto Feliz, 10 = Picinguaba

Tabela I. Locais e época de coleta de adultos de *Utetheisa ornatrix* no Estado de São Paulo.

Local	Coordenadas	Nº indivíduos coletados (♂/♀)	Mês/ano
Campinas I	22°44'S - 47°03'O	11 / 20	02/08
Campinas II	22°51'S - 47°04'O	8 / 17	02/08
Picinguaba	23°22'S - 44°50'O	7 / 16	03/08
Águas de Lindóia	22°26'S - 46°35'O	0 / 15	03/09
Mogi Guaçu	22°25'S - 46°54'O	11 / 11	03/09
Pirassununga	21°59'S - 47°29'O	5 / 6	03/09
Jardinópolis	21°02'S - 47°49'O	10 / 10	03/09
Rincão	21°37'S - 48°01'O	8 / 12	03/09
Rafard	23°03'S - 47°35'O	8 / 13	03/09
Porto Feliz	23°13'S - 47°28'O	10 / 10	03/09

Indivíduos adultos foram coletados utilizando rede entomológica em áreas abertas que apresentavam várias plantas do gênero *Crotalaria*. As áreas de Campinas I e II, Picinguaba, Pirassununga, Jardinópolis e Rincão apresentavam *Crotalaria pallida* e *C. lanceolata*; as áreas de Mogi Guaçu e Pirassununga apresentavam *C. micans*; Rafard apresentava *C. trichotoma* e Porto Feliz apresentava *C. trichotoma*, *C. pallida* e *C. lanceolata*. O fato de terem sido encontradas apenas essas espécies de *Crotalaria* nos locais de coleta não significa que existiam necessariamente apenas estas espécies localmente, porém, os indivíduos coletados estavam nessas plantas.

Os insetos foram mantidos vivos em sacos plásticos com bastante ar até serem levados para o laboratório onde foram colocados no freezer e armazenados em álcool 95% à temperatura de -18°C por 12 horas. Todos os indivíduos tiveram seu sexo determinado pela forma de seu abdômen de acordo com Travassos (1946) e suas asas destacadas antes da extração de DNA para posterior análise de morfometria que será feita futuramente.

3.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Wyzard® (Promega). O toráx foi macerado individualmente em $600\mu\text{l}$ da solução de lise de núcleo; o macerado permaneceu a 65°C por 12 horas. Em seguida o material foi colocado em temperatura ambiente por 5 min; $200\mu\text{l}$ da solução de precipitação de proteínas foram acrescentados e o produto foi mantido em gelo por 5 min. O tubo foi centrifugado a 18000 G por 6 min à 24°C e o sobrenadante foi separado em um novo tubo, ao qual foi acrescentado $600\mu\text{l}$ de álcool isopropílico e permaneceu a -84°C por 1h. Em seguida os tubos foram deixados em temperatura ambiente até que descongelassem e foram centrifugados a 18000 G por 4 min à 24°C . Os sobrenadantes foram descartados, $600\mu\text{l}$ de álcool etílico 70% foram acrescentados e o tubo foi centrifugado 18000 G por 3 min à 24°C e o sobrenadante descartado. O precipitado resultante secou em temperatura ambiente e foi reidratado com $50\mu\text{l}$ da solução de reidratação de DNA. Após 15 minutos o DNA purificado foi armazenado a -18°C para evitar degradação do material.

3.3. Amplificação do DNA

Para as amplificações do DNA foram utilizados os iniciadores obtidos do trabalho de Bezzerides *et al* (2004). Foram testadas diversas concentrações dos tampões AE (Quiagen) e de PCR (Invitrogen), DNA, dNTP, MgCl₂ e iniciadores. Para os loci Utor10 e Utor28 também foi tentado utilizar BSA e DMSO. Também foram testadas variações na temperatura e número de ciclos de anelamento e na temperatura de extensão final. As amplitudes das variações de concentrações de reagentes e de temperatura de anelamento e extensão final estão na Tabela II.

Tabela II. Volumes dos reagentes (μl) utilizados nas padronizações dos protocolos de amplificação de DNA de *U. ornatrix* utilizando os iniciadores Utor2, Utor7, UtorTAC1, Utor10 e Utor28 (Bezzerides *et al* 2004). O volume final de cada reação era de 25 μl .

Variáveis	Utor2	Utor7	UtorTAC1	Utor10	Utor28
Água MilliQ	*	*	*	*	*
Tampão AE	1,7	1,7	1,7	1,5 - 1,9	1,5 - 1,9
Tampão PCR (10X)	2,5	2,5	2,5	2,0 - 2,7	2,0 - 2,7
MgCl ₂ (50mM)	0,85 - 1,2	0,8 - 1,3	0,75 - 1,3	0,75 - 1,3	0,75 - 1,3
dNTP (10mM)	1,0	1,0	1,0	0,85 - 1,2	0,85 - 1,2
Iniciador Foward (10 μM)	1,0	1,0	1,0	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0
Iniciador Reverse (10 μM)	1,0	1,0	1,0	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0
Taq polimerase (5U/ μl)	0,2	0,2	0,2	0,15 - 0,2	0,15 - 0,2
DNA	0,8 - 1,2	0,8 - 1,1	0,8 - 1,3	0,75 - 2,5	0,75 - 2,5
BSA (0,1%)	-	-	-	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
DMSO	-	-	-	0,8 - 1,2	0,8 - 1,2
Temp. de anelamento (°C)	48 - 51	48 - 52	48 - 55	45 - 55	45 - 55
Nº de ciclos	35	35	35	30 - 35	30 - 35
Extensão final (°C)	72	72	72	70 - 72	70 - 72

* O volume de água MilliQ acrescentado nas reações era exato para completar os 25 μl de cada reação

3.4. Determinação dos tamanhos dos fragmentos

Os produtos da amplificação foram aplicados em géis de acrilamida 6% e foi realizada corrida eletroforética em solução tampão TE 1X, 100V durante 6 horas. Além dos produtos das amplificações também foi aplicado no gel um marcador de 50 pares de bases (Invitrogen[®]) para referência de tamanhos dos fragmentos. Após a eletroforese, os géis foram diafanizados e fotografados para serem analisados visualmente. A migração das bandas obtidas tiveram suas distâncias percorridas no gel medidas com o auxílio do programa CorelDRAW XIII[®] e os tamanhos dos fragmentos foram determinados utilizando o programa DNAfrag (Schaffer & Sederoff, 1981).

3.5. Análise dos resultados

As heretozigosidades esperadas foram calculadas utilizando o programa Genetix (Belkhir *et al* 1996–2004). Os níveis de estruturação populacional foram avaliados por estatísticas F (Wright 1965) utilizando o estimador θ de Weir & Cockerham (1984), com o programa Fstat (Goudet 2001), que também foi utilizado para o cálculo de riqueza alélica. O número de migrantes por geração (fluxo gênico, Nm) foi calculado pelo método de alelos exclusivos (Barton & Slatkin 1986) utilizando o programa Genepop (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008). Foi testado se as populações estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o método de Haldane (1954) e Guo & Thompson (1992) com o programa Genepop.

Como alelos nulos são frequentemente encontrados quando se trabalha com microssatélites em Lepidoptera, foi feita uma estimativa da frequência de alelos nulos nas

populações utilizando o algoritmo de EM (Dempster *et al* 1977). Em seguida as estimativas θ de Weir & Cockerham (1984) foram recalculadas utilizando o método para alelos nulos no programa FreeNA (Chapuis & Estoup 2007).

Como algumas populações estão muito próximas geograficamente, foi feita nova análise unindo as populações separadas por menos de 50 km: Campinas I e Campinas II, Mogi Guaçu e Águas de Lindóia, Rafard e Porto Feliz. Nesse caso, as distâncias geográficas foram calculadas tomando as médias das distâncias das populações originais em relação as demais.

Foi testado se há correlação entre as distâncias geográficas e diferenças genéticas por meio de um teste de Mantel (1967) utilizando os valores de F_{ST} e a distancia geográfica entre os pares de populações através do programa Genetix. As distâncias geográficas entre os locais de coleta foram calculadas utilizando o programa Google Earth[®] e os valores de F_{ST} entre pares de populações foram obtidos com o programa Fstat (Goudet 2001).

4. Resultados

4.1. Loci utilizados

Apenas as reações de amplificação de DNA com os iniciadores Utor2, Utor7 e UtorTAC1 foram bem sucedidas. Os iniciadores Utor10 e Utor28 não puderam ser utilizados porque não foi conseguida uma padronização das reações de amplificação.

4.2. Diversidade genética dentro das populações

O número de indivíduos genotipados de cada população e o número de alelos encontrados em cada um dos três loci utilizados estão na Tabela III. A riqueza alélica encontra-se na Tabela IV.

Tabela III. Número de alelos encontrados para cada locus em cada população e número de indivíduos genotipados (N).

População	Utor2	Utor7	UtorTAC1	N
Campinas I	19	14	11	28
Campinas II	16	13	13	25
Picinguaba	16	11	9	23
Águas de Lindóia	7	5	8	15
Mogi-Guaçu	12	11	9	22
Pirassununga	6	8	4	9
Jardinópolis	9	12	9	20
Rincão	14	11	9	20
Rafard	16	12	8	21
Porto Feliz	14	12	12	20

Tabela IV. Riqueza alélica encontrada para cada locus em cada população.

População	Utor2	Utor7	UtorTAC1
Campinas I	10,85	8,05	8,15
Campinas II	10,27	9,24	9,30
Picinguaba	10,40	7,68	6,78
Águas de Lindóia	6,12	4,49	6,69
Mogi-Guaçu	8,41	7,53	7,31
Pirassununga	5,87	8,00	3,99
Jardinópolis	6,95	8,70	6,34
Rincão	9,04	7,39	7,05
Rafard	9,78	8,72	6,42
Porto Feliz	9,98	8,69	8,15

A média de heterozigosidade para todas as populações é 0,347 (D.P. = 0,102) e em todas há uma grande deficiência de heterozigotos (Tabela V). Nenhuma população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Águas de Lindóia: $\chi^2 = 25.167$, $p < 0,001$; todas as demais: $\chi^2 = \infty$, $p =$ altamente significativo). O valor de F_{IS} foi elevado e significativo em todas as populações (Tabela VI).

Tabela V. Heterozigosidades esperadas (He) e observadas (Ho).

População	Utor2		Utor7		UtorTAC1		Geral	
	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho
Campinas I	0,923	0,346	0,836	0,500	0,879	0,536	0,879	0,461
Campinas II	0,915	0,200	0,900	0,440	0,902	0,200	0,906	0,280
Picinguaba	0,916	0,318	0,840	0,333	0,829	0,087	0,862	0,246
Águas de Lindóia	0,764	0,0	0,660	0,067	0,822	0,400	0,749	0,156
Mogi-Guaçu	0,877	0,182	0,822	0,636	0,853	0,591	0,851	0,470
Pirassununga	0,734	0,222	0,836	0,500	0,623	0,667	0,731	0,463
Jardinópolis	0,804	0,150	0,875	0,550	0,816	0,300	0,832	0,333
Rincão	0,875	0,200	0,791	0,650	0,822	0,250	0,830	0,367
Rafard	0,897	0,238	0,886	0,400	0,823	0,333	0,869	0,324
Porto Feliz	0,907	0,263	0,876	0,300	0,854	0,550	0,879	0,371

Tabela VI. Valores de F_{IS} em cada população para os loci Utor2, Utor7, UtorTAC1 e o F_{IS} geral.

População	Utor2	Utor7	UtorTAC	Geral
Campinas I	0,637	0,418	0,406	0,499*
Campinas II	0,789	0,526	0,786	0,701*
Picinguaba	0,666	0,619	0,900	0,726*
Águas de Lindóia	1,000	0,905	0,538	0,805*
Mogi-Guaçu	0,801	0,248	0,328	0,466*
Pirassununga	0,726	0,456	-0,011	0,419*
Jardinópolis	0,822	0,393	0,648	0,615*
Rincão	0,782	0,203	0,709	0,575*
Rafard	0,746	0,566	0,611	0,642*
Porto Feliz	0,723	0,672	0,378	0,595*

*valores significativos ($p < 0,05$)

4.3. Fluxo gênico

A frequência média de alelos exclusivos foi de $p(1) = 0,049$. O número de migrantes por geração encontrado foi de 2,813.

4.4. Alelos nulos

As estimativas de frequência de alelos nulos utilizando o algoritmo de Dempster *et al* (1977) para cada loci em cada população e geral encontram-se na Tabela VII. As frequências estimadas encontradas são elevadas e próximas as encontradas dentro do grupo Lepidoptera.

Porém, a quantidade de indivíduos “homozigotos nulos” encontrada é bem menor do que a esperada se as estimativas dos alelos nulos estiverem corretas. Foram encontrados apenas quatro indivíduos homozigotos nulos para o locus Utor2, cinco indivíduos para o locus Utor7 e nenhum para o locus UtorTAC1. Dessa forma, a presença de alelos nulos pode não ser tão importante para os loci estudados.

Tabela VII. Estimativa de frequências de alelos nulos para cada locus e cada população utilizando o algoritmo EM (Dempster *et al* 1977) (entre parênteses está o I.C. para as populações e desvio-padrão para a frequência nos três loci).

População	Utor2	Utor7	UtorTAC1
Campinas I	0,301 (0,211 - 0,393)	0,169 (0,082 - 0,277)	0,183 (0,099 - 0,289)
Campinas II	0,396 (*)	0,269 (0,170 - 0,404)	0,392 (*)
Picinguaba	0,336 (0,239 - 0,425)	0,277 (0,173 - 0,384)	0,045 (*)
Águas de Lindóia	0,435 (0,390 - 0,458)	0,362 (*)	0,231 (0,111 - 0,364)
Mogi-Guaçu	0,371 (0,279 - 0,443)	0,095 (0,021 - 0,211)	0,144 (0,055 - 0,270)
Pirassununga	0,305 (*)	0,184 (*)	0,045 ($1,0 \times 10^{-4}$ - 0,238)
Jardinópolis	0,396 (*)	0,175 (0,081 - 0,305)	0,281 (0,180 - 0,380)
Rincão	0,359 (0,266 - 0,438)	0,023 (*)	0,318 (0,210 - 0,415)
Rafard	0,347 (0,255 - 0,429)	0,258 (0,154 - 0,372)	0,272 (0,165 - 0,379)
Porto Feliz	0,339 (0,236 - 0,432)	0,335 (0,238 - 0,424)	0,045 (0,062 - 0,284)
Frequência loci	0,358 (\pm 0,042)	0,218 (\pm 0,105)	0,196 (\pm 0,124)

* intervalo de confiança não disponível

4.5. Diferenciação entre populações

O valor de F_{ST} para o locus Utor2 foi 0,032, para o locus Utor7 foi de 0,032 e para o locus UtorTAC1 foi de 0,034. O valor de F_{ST} multilocus entre todas as populações foi 0,033 (I.C. 95% = 0,032 - 0,0338). Considerando a presença de alelos nulos o valor de F_{ST} para o locus Utor2 foi 0,020, para o locus Utor7 foi 0,028, para o locus UtorTAC1 foi 0,033 e o F_{ST} multilocus foi 0,027.

Os valores de $F_{ST}(\theta)$ entre pares de populações sem considerar alelos nulos estão na Tabela VIII. Já os valores de $F_{ST}(\theta)$ entre pares de populações considerando a presença de alelos nulos está na Tabela IX. Em ambas as tabelas os menores valores são os encontrados entre as populações Campinas I e II com as demais e os maiores valores são os encontrados entre as populações Pirassununga e Águas de Lindóia com as demais.

Tabela VIII. Valores de F_{ST} entre pares de populações sem considerar alelos nulos (AL = Águas de Lindóia; PIR = Pirassununga; RAF = Rafard; MOG= Mogi Guaçu; POR = Porto Feliz; PIC = Picinguaba; RIN = Rincão; CAI = Campinas I; JAR = Jardinópolis; CII = Campinas II).

	AL	PIR	RAF	MOG	POR	PIC	RIN	CAI	JAR
PIR	0,125*								
RAF	0,042	0,078							
MOG	0,060*	0,092*	0,032*						
POR	0,064	0,078	0,008	0,031*					
PIC	0,051	0,052	0,039*	0,038*	0,013				
RIN	0,037	0,105*	0,050*	0,054*	0,018	0,006			
CAI	0,029	0,082	0,016	0,027	0,008	0,012	0,003		
JAR	0,099*	0,097*	0,011	0,056*	0,010	0,039	0,040	0,026	
CII	0,060*	0,072	0,027*	0,023	-0,004	0,008	0,008	0,008	0,026

* Valores significativos ($p < 0,05$, valores de p obtidos após 900 permutações)

Tabela IX. Valores de F_{ST} entre pares de populações considerando alelos nulos (AL = Águas de Lindóia; PIR = Pirassununga; RAF = Rafard; MOG= Mogi Guaçu; POR = Porto Feliz; PIC = Picinguaba; RIN = Rincão; CAI = Campinas I; JAR = Jardinópolis; CII = Campinas II).

	AL	PIR	RAF	MOG	POR	PIC	RIN	CAI	JAR
PIR	0,109								
RAF	0,022	0,082							
MOG	0,043	0,089	0,029						
POR	0,039	0,079	0,010	0,028					
PIC	0,029	0,073	0,026	0,032	0,009				
RIN	0,021	0,102	0,044	0,050	0,021	0,012			
CAI	0,013	0,082	0,015	0,023	0,008	0,006	0,003		
JAR	0,056	0,087	0,006	0,043	0,005	0,016	0,029	0,016	
CII	0,039	0,095	0,021	0,030	0,004	0,008	0,015	0,005	0,017

4.6. Correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas

O teste de Mantel correlacionando diferença genética e distância geográfica não apresentou valor significativo ($Z = 505,09$; $p = 0,62$) (Figura 2a). Um novo teste de Mantel foi feito após união das populações que estão separadas por menos de 50 km e os valores também não foram significativos ($Z = 264,44$; $p = 0,84$) (Figura 2b). Dessa forma, não há correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas entre essas populações.

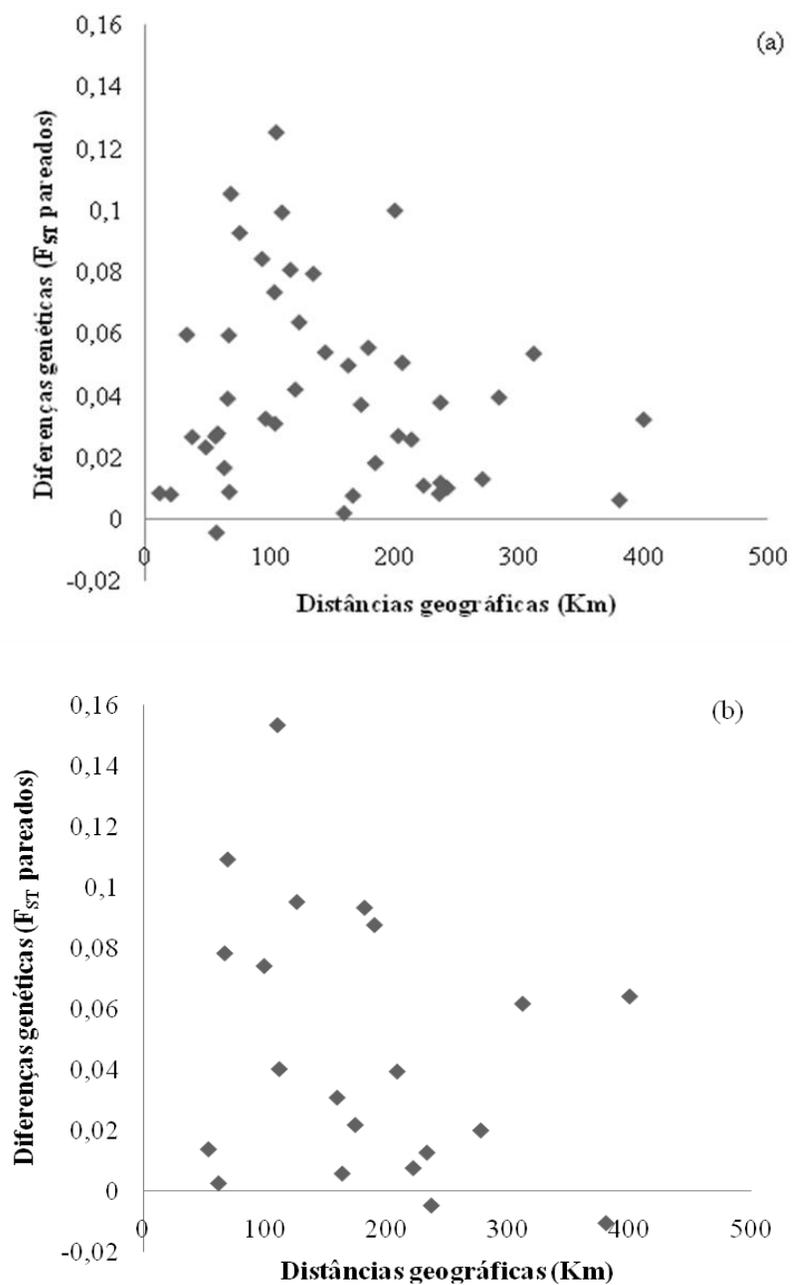


Figura 2. (a) Relação entre a distância geográfica (Km) entre pares de populações e suas respectivas diferenças genéticas (θ). (b) Relação entre a distância geográfica (Km) entre pares de OTUs (populações com distância inferior a 50km unidas) e suas respectivas diferenças genéticas (θ).

5. Discussão

O número de alelos encontrados dentro das populações foi elevado para os três loci em todas as populações, exceto Águas de Lindóia e Pirassununga (que são as menores amostras). Em Águas de Lindóia a riqueza alélica foi baixa para Utor2 e Utor7, em Pirassununga foi baixo para Utor2 e UtorTAC1. Apesar de não terem sido estimados a quantidade de plantas-hospedeiras e o tamanho populacional de mariposas, aparentemente nestas duas localidades havia poucas plantas-hospedeiras e a visualização de mariposas foi inferior a outras localidades. A menor visualização de mariposas pode indicar que as populações eram menores e explicaria esse menor número de alelos encontrados.

O número de alelos encontrados em cada uma das oito populações restantes são próximos aos encontrados por Bezzerides *et al* (2004), que utilizou os mesmos iniciadores, porém, em uma amostragem de 105 indivíduos. Logo, possivelmente o esforço amostral das coletas foi suficiente para representar adequadamente as diversidades genéticas de cada população.

Foi constatada uma grande diferença entre as heterozigoidades observada (H_o) e esperada (H_e), o que mostra que nenhuma das populações estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os valores de H_o e H_e encontrados são parecidos com os obtidos por Bezzerides *et al* (2004) em sua população de *U. ornatix*, que não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os loci Utor2, Utor7 e UtorTAC1.

Os resultados encontrados mostram valores de F_{IS} elevados, ou seja, populações com elevada proporção de indivíduos homozigotos para os loci utilizados. Os dois valores extremos de F_{IS} são os encontrados em Pirassununga (0,419) e Águas de Lindóia (0,805), que são as menores amostras. Porém, as duas maiores amostras, Campinas I e Campinas II, também estão

próximas dos valores extremos (respectivamente, 0,499 e 0,701), então o tamanho da amostra pode não ter influenciado nos valores de F_{IS} .

Foi encontrada baixa estruturação genética para *Utetheisa ornatix*. Os valores de F_{ST} encontrados para cada um dos três loci utilizados são próximos entre si e próximos do valor de F_{ST} encontrado quando os três loci são utilizados conjuntamente (0,032 para Utor2 e Utor7, 0,034 para UtorTAC1 e 0,0328 para os três loci unidos). Porém, apesar de a estruturação genética ser baixa, ela é significativa ($F_{ST} = 0,0328$, I.C. 95% = 0,03205 - 0,03384), mostrando que existe alguma diferenciação entre as populações. Porém, a estruturação genética encontrada não está correlacionada com a distância geográfica entre as populações, mas concentrada nas populações de Águas de Lindóia, Pirassununga e Mogi Guaçu (Tabela VII).

O cenário descrito pelos resultados mostra populações de *U. ornatix* com grande deficiência de heterozigotos e uma baixa estruturação genética que não é explicada pela distância geográfica. A deficiência de heterozigotos e desvios do EHW em *U. ornatix* já haviam sido encontrados por Bezzerides *et al* (2004), que levantou duas hipóteses para explicar seus resultados: presença de alelos nulos e endogamia nas populações.

Apesar da baixa frequência de homozigotos nulos encontrados, alelos nulos são frequentemente encontrados quando se trabalha com microssatélites em Lepidoptera, logo, é uma hipótese plausível para explicar pelo menos parte da elevada deficiência de homozigotos e do desvio do EHW (Megléc & Solignac 1998; Williams *et al.* 2003, Harper *et al* 2003, Meglec *et al* 2004). Porém, a maior parte da deficiência de heterozigotos e desvios do EHW pode estar relacionada com o comportamento reprodutivo de *U. ornatix* e sua dinâmica populacional.

Fêmeas de *U. ornatix* copulam com diversos machos, porém, não distinguem machos aparentados de machos não aparentados, nem machos com quem já copulou de machos com

quem não copulou, e utilizam o esperma de poucos machos para a fecundação (Bezzerides *et al* 2004, Bezzerides & Endler 2008). Normalmente indivíduos de *U. ornatix* permanecem toda a sua vida em uma mesma mancha de vegetação; logo, muitas vezes grande parte ou mesmo a totalidade da prole pode ser resultado de uma cópula entre indivíduos aparentados, o que é chamado de microestrutura populacional. Como fêmeas escolhem machos maiores e ovipõem mais ovos, e o tamanho corpóreo é uma característica herdável, é provável que indivíduos grandes que copulem sejam irmãos. Além disso, *U. ornatix* é dependente de *Crotalaria* para todo o seu ciclo de vida e manchas desta planta são constantemente eliminadas por queimadas e por corte. Essa dinâmica local pode manter pequenas as populações locais da mariposa, dessa forma a chance de acasalamento entre indivíduos aparentados é provável, o que poderia explicar a endogamia encontrada nas populações do presente trabalho e de Bezzerides *et al* (2004).

Com relação a estrutura genética da espécie, os valores de F_{ST} entre populações pareadas (Tabela VII) mostram que Mogi Guaçu, Rafard, Águas de Lindóia e Pirassununga são as populações mais diferenciadas geneticamente entre as dez utilizadas neste trabalho. Mogi Guaçu apresenta diferenças genéticas significativas com sete populações, enquanto que Águas de Lindóia e Pirassununga apresentam diferenças significativas entre si e com mais três populações cada. Rafard também apresenta diferenças genéticas significativas com quatro populações.

Águas de Lindóia e Pirassununga são as populações com maiores valores de F_{ST} pareadas. A maior estruturação encontrada nessas duas populações pode ser resultado de seus tamanhos populacionais. Devido à menor visualização de mariposas e plantas-hospedeiras nessas duas localidades, foi sugerido que essas duas populações são as menores entre as 10 amostradas. Se realmente estas populações são as menores, elas são as mais suscetíveis aos efeitos de deriva genética, o que explica sua maior diferenciação em relação às outras.

A estruturação encontrada em Mogi Guaçu e Rafard é inesperada, pois as características dessas populações são similares as demais (exceto Águas de Lindóia e Pirassununga). Seu tamanho amostral é parecido com Porto Feliz, Rincão e Jardinópolis, e não tão menor que Campinas I e II. A única diferença aparente entre Mogi Guaçu, Rafard e as demais populações amostradas é a espécie de *Crotalaria* avistada no local. Enquanto que na maioria dos locais de coleta as plantas-hospedeiras avistadas eram *C. lanceolata* e *C. pallida*, a espécie encontrada em Mogi Guaçu era *C. micans*, que também foi a encontrada em Águas de Lindóia, e a espécie encontrada em Rafard era *C. trichotoma*. Não foi feito nenhum teste para confirmar se as mariposas encontradas em cada local utilizaram apenas as espécies de *Crotalaria* avistadas durante as coletas. Porém, os resultados desse trabalho mostraram que onde haviam plantas-hospedeiras diferentes, havia alguma estruturação genética das populações de *U. oratrix*.

Originalmente *U. oratrix* se alimentava das espécies de *Crotalaria* nativas das Américas, mas atualmente sua principal planta-hospedeira em diversos locais é *C. pallida*, uma espécie africana que foi introduzida no século XVI e se espalhou por todo o continente (Ferro 2001). Talvez o uso de uma espécie hospedeira diferente dificulte o acasamento de indivíduos da população de Mogi Guaçu e Rafard com indivíduos de outras regiões, o que resulta na estruturação genética encontrada. Já foram encontradas evidências de adaptação local de *U. oratrix* a sua planta-hospedeira: machos e fêmeas apresentaram desempenhos diferentes quando utilizaram plantas-hospedeiras de localidades diferentes das que nasceram (Cogni & Futuyma 2008).

Insetos herbívoros apresentam forte associação com suas plantas-hospedeiras, tanto para alimentação como habitat primário. Mudanças de planta hospedeira podem causar mudanças de comportamento e diminuir as oportunidades de acasalamento entre indivíduos que nasceram em

plantas de espécies diferentes (Egan *et al* 2008, Grace *et al* 2010). A utilização de plantas-hospedeiras diferentes por uma mesma espécie de herbívoro pode ser importante para a sua estrutura genética, como é o caso da mariposa *Prodoxus coloradensis* (Drummond *et al* 2010). A variação genética entre populações de *Prodoxus coloradensis* está relacionada com a planta-hospedeira que é utilizada localmente, o que indica o começo de um processo de isolamento reprodutivo, o que pode estar acontecendo com *U. ornatix*.

As demais populações de *U. ornatix* apresentam valores baixos e não significativos de F_{ST} pareados, o que, juntamente com o F_{ST} geral encontrado, mostra que a espécie apresenta baixa estruturação genética. Baixa estruturação genética é encontrada para diversas espécies de mariposas e a hipótese levantada para justificar este fato é a capacidade de vôo destes organismos que permite que haja grande fluxo gênico (Endersby *et al* 2006).

Manchas de *Crotalaria* são comuns em ambientes perturbados, como pastos e acostamentos de estradas (Lorenzi 1982), o que pode permitir que haja conexão entre populações distantes de *U. ornatix*. Levando em conta a habilidade de vôo de *U. ornatix*, seu tempo de fase adulta e a grande quantidade de manchas de *Crotalaria* no Estado de São Paulo é cabível que alguns indivíduos migrem e se reproduzam em áreas vizinhas ou mesmo separadas por longas distâncias. A migração para outras manchas poderia ocorrer, por exemplo, quando há escassez de recursos no local onde os indivíduos nasceram ou passivamente por indivíduos que acidentalmente entrem em veículos que passam por essas estradas próximas as manchas de *Crotalaria*.

A escassez de recursos para *U. ornatix* pode ser comum visto que manchas de *Crotalaria* são eliminadas por ação antrópica constantemente. Não havendo a planta-hospedeira os adultos devem migrar para se reproduzir. Havendo fluxo gênico suficiente as populações não

se diferenciam e não há estruturação genética entre elas. O teste de Mantel não mostrou correlação entre diferenças genéticas e distância geográfica entre as populações utilizadas no trabalho, o que também sugere que *U. ornatrix* consegue dispersar por grandes distâncias.

Baixa estruturação genética e alta endogamia foram encontradas para a mariposa *Grapholita (=Cydia) molesta* (Torriani *et al* 2010). Essa mariposa é tida como praga de culturas e seu manejo é feito muitas vezes através do uso de pesticidas. Uma população que ficou dois anos sem manejo apresentou F_{IS} igual a 0,039, enquanto que para outras duas populações que não tiveram o manejo interrompido os F_{IS} foram próximos a 0,2 e a 0,3. Estes números indicam que populações que não podem aumentar muito seu tamanho acabam sendo mais endogâmicas, o que pode acontecer nas populações de *U. ornatrix* quando as manchas de vegetação em que se encontram são destruídas por ação antrópica. Outro dado apresentado por Torriani *et al* (2010) é o efeito fundador na população que apresenta o menor tamanho efetivo dentre as amostradas. Esta população era uma das que apresentava maior valor de F_{IS} .

Grapholita (=Cydia) molesta assim como *U. ornatrix*, tem grande distribuição geográfica e é considerada praga agrícola. Torriani *et al* (2010), utilizando microssatélites, encontrou estruturação genética semelhante ($F_{ST} = 0,042$) à encontrada em *U. ornatrix* e ausência de correlação entre distância geográfica e diferenças genéticas. Uma explicação para a baixa estruturação genética é o fato que as populações de *G. molesta* estão próximas de estradas, o que poderia causar uma dispersão passiva através de veículos. Esse fluxo gênico através de dispersão passiva foi hipotetizado em um estudo com esta espécie na África do Sul (Timm *et al* 2008) e outro na América do Sul (Fuentes-Contreras *et al* 2008), pois em ambos os casos populações separadas por mais de 100km apresentavam baixa diferenciação genética.

Outra hipótese levantada para explicar essa baixa estruturação em *G. molesta* é o

comportamento de oviposição das fêmeas: normalmente ovipõem em seu local de nascimento, mas quando há escassez de recursos elas tendem a dispersar para oviporem (Hughes & Dorn 2002, Hughes *et al* 2004). Assim como as fêmeas de *G. molesta*, o comportamento de oviposição de *U. ornatrix* pode resultar em baixa estruturação genética. A fêmea de *U. ornatrix* ovipõe em grupos de poucos ovos por vez e durante vários dias, sendo possível que ela possa copular com machos de um local e ovipor em outro local, o que aumenta o fluxo gênico e diminui as diferenças genéticas entre as populações. Como existe grandes chances da fêmea ter copulado com um macho aparentado em sua mancha natal, a prole resultante dos primeiros ovos ovipostos na nova mancha será composta por indivíduos homozigotos, mantendo a deficiência de heterozigotos na população.

6. Conclusões e perspectivas

Utetheisa ornatix é uma espécie que apresenta elevado déficit de heterozigotos dentro de suas populações. Mesmo sendo uma espécie cuja fêmea seja promíscua, essa promiscuidade não reflete em diminuição da endogamia, possivelmente porque fêmeas não evitam acasalamento com machos aparentados e utilizam o esperma de poucos machos para se fecundar. Além disso, as populações de *Utetheisa ornatix* estão sujeitas a constantes diminuições de tamanho devido a perturbações antrópicas nas manchas de sua planta-hospedeira, o que acaba facilitando o cruzamento entre indivíduos aparentados.

Em relação à estrutura genética de *U. ornatix*, os resultados deste trabalho mostram que a variabilidade genética da espécie está bem distribuída entre as populações, o que aponta para um cenário de grande fluxo gênico. Esse elevado fluxo gênico é explicado pela capacidade de vôo dos adultos e tempo de vida dos indivíduos. As perturbações em manchas de *Crotalaria* podem ser um estímulo para que haja mais dispersão entre áreas próximas e a disponibilidade de plantas-hospedeiras por toda a região estudada pode explicar a conectividade mesmo entre áreas distantes geograficamente.

Os resultados obtidos neste trabalho levantam questões que podem ser respondidas em trabalhos posteriores que estudem como uma população de determinado local se comporta ao longo do tempo (chegada de migrantes, mudanças do tamanho populacional, capacidade de dispersão). Neste trabalho poderia ser estudado como oscilações no tamanho populacional estão afetando geneticamente as populações, se ocorrem mudanças na diversidade genética da população ao longo do tempo.

Outra sugestão para um trabalho futuro é testar se a espécie de *Crotalaria* em que o

indivíduo nasce influencia na escolha de parceiros para acasalamento. Essa sugestão é dada porque no local onde foram coletadas duas das três populações que apresentaram alguma estruturação genética haviam espécies diferentes de planta hospedeira.

Referências Bibliográficas

- Barton, N.H. & Slatkin, M. (1986). A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity 56: 409-415.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996–2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier. Available at <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>
- Bezzerides, A. (2004). Phenotypic and genetic benefits of promiscuity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Dissertação de Ph.D., Cornell University, Ithaca.
- Bezzerides, A. & Eisner, T. (2002). Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid from more than one male source. Chemoecology 12:213–218.
- Bezzerides, A.; Bezzerides, J. & Eisner, T. (2004). Isolation of five polymorphic microsatellite markers in *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae). Molecular Ecology Notes 4: 566–567.
- Bezzerides, A.; Iyengar, V.K. & Eisner, T. (2008). Female promiscuity does not lead to increased fertility or fecundity in an Arctiid Moth (*Utetheisa ornatrix*). Journal of Insect Behaviour 21: 213–221
- Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution 24: 621–631.
- Cogni, R. & Futuyma, D.J. (2008). Local adaptation in a plant herbivore interaction depends on the spatial scale. Biological Journal of the Linnean Society 97: 494–502.

- Collier, N.; Gardner, M.; Adams, M.; McMahon, C.R.; Benkendorff, K. & Mackay, D.A. (2010). Contemporary habitat loss reduces genetic diversity in an ecologically specialized butterfly. Journal of Biogeography 37: 1277–1287
- Conner, W.E.; Eisner, T.; Vander Meer, R.K.; Guerrero, A.; Ghiringelli, D. & Meinwald, J. (1980). Sex attractant of an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): a pulsed chemical signal. Behavioral Ecology Sociobiology 7: 55–63
- Conner, W.E.; Eisner, T.; Vander Meer, R.K.; Guerrero, A. & Meinwald, J. (1981). Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): Role of a pheromone derived from dietary alkaloids. Behavioral Ecology Sociobiology 9: 227–235
- Conner, W.E.; Roach, B.; Benedict, E.; Meinwald, J. & Eisner, T. (1990). Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. Journal of Chemical Ecology 16: 543–552
- Curril, I.M. & LaMunyon, C.W. (2006). Sperm storage and arrangement within females of the arctiid moth *Utetheisa ornatrix*. Journal of Insect Physiology 52:1182–1188
- Dempster, A.P.; Laird, N.M. & Rubin, D.B. (1977). Maximum Likelihood from incomplete data via the EM algorithm (with discussion). Journal of the Royal Statistical Society. B 39: 1-38.
- Dussourd, D.E.; Ubik, K.; Harvis, C.; Resch, J.; Meinwald, J.; & Eisner, T. (1988). Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85:5992–5996
- Dussourd, D.E.; Harvis, C.A.; Meinwald, J. & Eisner, T. (1991). Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88:9224–9227

- Dres, M. & Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society B 357: 471-492.
- Drummond, C.S.; Xue, H-J.; Yoder, J.B. & Pellmyr, O. (2010). Host-associated divergence and incipient speciation in the yucca moth *Prodoxus coloradensis* (Lepidoptera: Prodoxidae) on three species of host plants. Heredity 105: 183-196.
- Egan, S.P.; Nosil, P. & Funk, D.J. (2008). Selection and genomic differentiation during ecological speciation: isolating the contributions of host- association via a comparative genome scan of *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. Evolution 62:1162–1181.
- Eisner, T. & Meinwald, J. (1995). The chemistry of sexual selection. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 50–55.
- Eisner, T. & Eisner, M. (1991). Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid containing moth, *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. Psyche 98:111–118
- Eisner, T.; Eisner, M.; Rossini, C.; Iyengar, V.K.; Roach, B.L.; Benedikt, E. & Meinwald, J. (2000). Chemical defense against predation in an insect egg. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 1634–1639.
- Endersby, N.M.; Hoffmann, A.A.; McKechnie, S.W. & Weeks, A.R. (2006). Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia?. Entomologia Experimentalis et Applicata 122: 253–263
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1969). Differentiation of populations. Science 165: 1228–1232.
- Ferro, V.G. (2001). Padrões de utilização de *Crotalaria* spp. (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalarieae) por larvas de *Utetheisa ornatrix* (Lepidoptera, Arctiidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Ferro, V.G.; Guimarães, P.R. & Trigo, J.R. (2006). Why do larvae of *Utetheisa ornatrix*

- penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. Entomologia Experimentalis et Applicata 121: 23–29.
- Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fuentes-Contreras, E.; Espinoza, J.L.; Lavandero, B. & Ramirez, C.C. (2008). Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in central Chile. Journal of Economic Entomology. 101: 190–198.
- González, A.; Rossini, C.; Eisner, M. & Eisner, T. (1999). Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96:5570–5574.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Grace, T.; Wisely, S.M.; Brown, S.B.; Dowell, F.E. & Joern, A. (2010). Divergent host plant adaptation drives the evolution of sexual isolation in the grasshopper *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae) in the absence of reinforcement. Biological Journal of the Linnean Society 100: 866–878.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48: 361-372.
- Haldane, J.B.S. (1954). An exact test for randomness of mating. Journal of Genetics 52: 631-635.
- Hare, J.F. & Eisner, T. (1993). Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. Oecologia 96:9–18.
- Harper, G.L.; Maclean, N. & Goulson, D. (2003). Microsatellite markersto assess the influence

- of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. Molecular Ecology, **12**, 3349–3357.
- Hartl, D.L. & Clark, G.C. (1997). Principles of Population Genetics, 3^a ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts: 1–530
- Hanski, I.; Kuussaari, M. & Nieminen, M. (1994). Metapopulation structure and migration in the butterfly *Melitaea cinxia*. Ecology 75:747–762
- Haymer, D.S. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? Annals of the Entomological Society of America 87:717-22
- Hedrick, P. (2005). Genetics of Populations, 3^aed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Hill, J.K.; Thomas, C.D. & Lewis, O.T. (1996). Effects of habitat patch size and isolation on dispersal by *Hesperia comma* butterflies: implications for metapopulation structure. Journal of Animal Ecology 65:725–735.
- Hughes, J. & Dorn, S. (2002). Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. Entomologia Experimentalis et Applicata 103: 171–182.
- Hughes, J.; Hern, A. & Dorn, S. (2004). Preimaginal environment influences adult flight in *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). Environmental Entomology 33: 1155–1162.
- Iyengar, V.K. (2009). Experience counts: females favor multiply mated males over chemically endowed virgins in a moth (*Utetheisa ornatrix*). Behavioral Ecology and Sociobiology 63:847–855
- Iyengar, V.K. & Eisner, T. (1999a). Heritability of body mass, a sexually selected trait, in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA

96:9169–9171

- Iyengar, V.K. & Eisner, T. (1999b). Female choice increases offspring fitness in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96:15013–15016
- Iyengar, V.K.; Rossini, C. & Eisner, T. (2001). Precopulatory assessment of male quality in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): hydroxydanaidal is the only criterion of choice. Behavioral Ecology and Sociobiology 49:283–288
- Keyghobadi, N.; Roland, J. & Strobeck, C. (1999). Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). Molecular Ecology 8: 1481-1495.
- Keyghobadi, N.; Roland, J. & Strobeck, C. (2005). Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. Molecular Ecology 14: 1897–1909
- LaMunyon, C.W. & Eisner, T. (1993). Postcopulatory sexual selection in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90:4689–4692
- LaMunyon, C.W. & Eisner, T. (1994). Spermatophore size as determinant of paternity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91:7081–7084.
- LaMunyon, C.W. (1997). Increased fecundity as a function of multiple mating, in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. Ecological Entomology 22:69–73.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A. & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology

11: 2453–2465.

Lorenzi, H. (1982). *Plantas doninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, tóxicas e medicinais*. Edição do autor, Nova Odessa.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209–220.

Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.

Meglecz, E. & Solignac, M. (1998). Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera). Hereditas 128: 179–180.

Meglecz, E.; Petenian, F., Danchin, E. *et al.* (2004). High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. Molecular Ecology 13: 1693–1700.

Megléc, E.; Anderson, S.J.; Bourguet, D. *et al* (2007). Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. Insect Molecular Biology 16: 175–185

Orsini, L.; Corander, J.; Alasentie, A. & Hanski, I. (2008). Genetic spatial structure in a butterfly metapopulation correlates better with past than present demographic structure. Molecular Ecology 17: 2629–2642

Pease, R.W. Jr. (1968). Evolution and hybridization in the *Utetheisa ornatrix* complex. I. Inter- and intrapopulation variation and its relation to hybridization. Evolution 22:719–735.

Peterson, M.A. & Denno, R.F. (1998). The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. The American Naturalist 152(3): 428-446.

Queller, D.C.; Strassmann, J.E. & Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. Trends in Ecology & Evolution 8:285-288

- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Heredity 86:248-249
- Rossini, C.; González, A. & Eisner, T. (2001). Fate of an alkaloidal nuptial gift in the moth *Utetheisa ornatix*: systemic allocation for defense of self by the receiving female. Journal of Insect Physiology 47: 639–647.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.
- Saccheri, I.J.; Kuussaari, M.; Kankare, M. *et al.* (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature 392: 491–494.
- Sarver, M. (2002). Multiple mating and mate choice in an arctiid moth (*Utetheisa ornatix*). Tese de conclusão de curso, Cornell University, Ithaca, NY, USA
- Schaffer, H.E. & Sederoff, R.R. (1981). Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. Analytical Biochemistry 115: 113-122
- Sigaard, P.; Pertoldi, C.; Madsen, A.B.; Sjøgaard, B. & Loeschcke, V. (2008). Patterns of genetic variation in isolated Danish populations of the endangered butterfly *Euphydryas aurinia*. Biological Journal of the Linnean Society 95: 677-687.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139: 457-462.
- Timm, A.E.; Geertsema, H. & Warnich, L. (2008). Population genetic structure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in South Africa. Annals of the Entomological Society of America 101: 197–203.
- Torriani, M.V.G.; Mazzi, D.; Hein, S. & Dorn, S. (2010). Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. Molecular Ecology 19:2651–2660

- Travassos, L. (1946). Contribuição ao conhecimento dos “Arctiidae” XI. Gênero “*Utetheisa*” Hübner, 1891. Verificação de “*U. pulchella*” (L., 1758) Kirby, 1892, no Nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Biologia 6: 343-354
- Trigo, J.R. (2010). Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. Phytochemistry Reviews.
- Valdes, A.M.; Slatkin, M. & Freimer, N.B. (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. Genetics 133:737-749
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Weller, S.J.; Jacobson, N.L. & Conner, W.E. (1999). The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). Biological Journal of Linnean Society 68: 557–578
- Williams, B.L.; Brawn, J.D. & Paige, K.N. (2003). Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). Molecular Ecology 12: 11–20.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. Genetics 16:97-159
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. Genetics 28: 114-138
- Wright, S. (1951). The genetical structure of natural populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.
- Wright, S. (1977). Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 3. University of Chicago Press, Chicago.