

Filogenia molecular das espécies de borboletas do gênero *Doxocopa* (Nymphalidae: Apaturinae)

Palavras-Chave: Sistemática, Papilionoidea, Zoologia

Autores(as):

Luca de BernardinStadoan, IB - UNICAMP

Patrícia Avelino Machado, IB - UNICAMP

Eduardo de Proença Barbosa, IB – UNICAMP

Luiza de Moraes Magaldi, IB- UNICAMP

Keith Richard Willmott – FLMNH

André Victor Lucci Freitas, IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Nymphalidae é a mais diversa entre as famílias de borboletas, englobando aproximadamente 6400 espécies, divididas em 12 subfamílias (Chazot *et al.* 2021). As borboletas da família Nymphalidae se destacam por sua enorme diversidade de tamanhos, formas alares, utilização de planta hospedeira e outras características que despertam a atenção dos cientistas (Wahlberg *et al.* 2009). Além disso, são organismos fáceis de serem observados, coletados e possuem diversos atributos que os tornaram um bom modelo de estudos evolutivos e ecológicos (Boggs *et al.* 2003). Apesar de filogenias robustas terem sido publicadas para Nymphalidae nos últimos anos (Wahlberg *et al.* 2009, Chazot *et al.* 2021), ainda há grupos dentro dos ninfalídeos que não possuem hipótese filogenética. Dado o papel fundacional da sistemática filogenética para compreensão acerca da diversidade biológica (Soltis & Soltis 2003), a ausência de hipóteses filogenéticas para determinados grupos, limita a potencial utilização desses grupos como organismo modelo.

Dentre os gêneros de Nymphalidae, *Doxocopa* (Apaturinae) se destaca como um dos grupos que não possuem uma hipótese filogenética. A distribuição do gênero se estende desde o Texas até o norte da Argentina (Bizarro 2002), incluindo as ilhas caribenhas de Cuba e Hispaniola. Há grandes divergências acerca de seu número de espécies, com autores apontando de 15 a 18 espécies válidas (Lamas 2004, Bizarro 2002, Warren *et al.* 2023). *Doxocopa* apresenta marcado dimorfismo sexual (Bizarro 2002), e diversas de suas espécies têm grande similaridade com membros de outros grupos de borboletas, como *Adelpha*, *Callicorini* e *Preponini*. Tal semelhança pode estar relacionada com o mimetismo de escape (Pinheiro & Freitas 2014), um fenômeno que vem recebendo atenção e suporte empírico recentemente (Paéz *et al.* 2021, Loeffler-Henry & Sherratt 2024).

Entretanto, a utilização *Doxocopa* como modelo de estudo é limitado pela ausência de uma hipótese filogenética morfológica ou molecular para o grupo. Assim, o presente trabalho se propõe a obter uma filogenia robusta para o gênero *Doxocopa* utilizando marcadores moleculares, de forma a elucidar as relações filogenéticas deste gênero. Com os dados obtidos forneceremos um arcabouço taxonômico que permitirá a utilização de espécies do gênero do *Doxocopa* como modelo de estudo.



Fig. 1. Prancha representando a diversidade morfológica de *Doxocopa*. A e B – *Doxocopa thoe*; C e D - *D. lavinia*; E e F – *D. felderi*; G e H – *D. linda*. A primeira letra corresponde à vista dorsal, e a segunda à ventral. Escala = 1 cm.

METODOLOGIA:

Amostragem:

Estavam disponíveis para execução deste projeto 60 indivíduos de *Doxocopa* de 24 localidades, advindos de coletas realizadas pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Borboletas (LABBOR) da UNICAMP. O colaborador do projeto, Dr. Keith R. Willmott (FLMNH) disponibilizou sequências de DNA de 16 indivíduos, além de amostras de tecido para futuras extrações de DNA e extrações prontas oriundas de 11 indivíduos. Para aumentar a cobertura amostral e obter uma filogenia robusta, inserimos sequências de grupos externos e sequências de outras espécies de *Doxocopa* disponíveis do database online Genbank (Benson et al., 2005). No total, foram amostradas 19 das 21 espécies putativas de *Doxocopa*.

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA foi extraído a partir de tecido de pernas utilizando o protocolo Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen AG) e armazenado a -20°C . Para este estudo, foram utilizados três marcadores moleculares amplamente utilizados para estudos de sistemática filogenética em borboletas (e.g. Nakahara et al. 2021, Garzón-Orduña et al. 2024): o marcador mitocondrial COI (região Barcode, 658 bp) (Folmer et al. 1994, Silva-Brandão et al. 2015) e os marcadores nucleares RpS5 (616 bp) e GAPDH (691 bp) (Wahlberg & Wheat 2008).

As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de $26\mu\text{L}$ e seguiram os protocolos estabelecidos por Silva Brandão et al. 2015 e Wahlberg & Wheat 2008. As amostras foram submetidas a uma eletroforese no gel de agarose 1,5% com tampão Tris-Acetato (TAE) (PH 7,5-7,8) e sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 GenomeAnalyzer (Life Technologies).

Análise dos dados

Os cromatogramas gerados foram inspecionados visualmente no programa Finch TV 1.4.0 (Patterson, Chamberlain & Thayer 2004), as sequências consenso foram geradas e alinhadas manualmente no programa BioEdit (Hall 1999). Duas hipóteses filogenéticas foram feitas através do portal online CIPRES: uma utilizando a Máxima Verossimilhança (ML) e uma inferência bayesiana (Bs).

A análise de ML foi realizada no programa IQTree v.2.2.2.7 (Nguyen *et al.* 2015). Os dados foram particionados por gene e por códon, e a seleção do modelo foi feita de maneira automática utilizando o programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017). O suporte dos nós foi avaliado com três testes: o Ultrafast Bootstrap (Minh *et al.* 2013) com a opção ‘-bnni’ para reduzir as violações ao modelo, o teste de approximate likelihood ratio Shimodaira-Hasegawa (-SH-aLRT) (Guindon *et al.* 2010; Hoang *et al.* 2018) e o teste aBayes (Anisimova *et al.* 2011).

A análise Bs foi feita utilizando o programa Mr.Bayes 3.2.7 (Ronquist *et al.* 2012). Os dados foram particionados por gene e códon e a opção “nst = mixed” foi usada para amostrar entre os modelos de substituição, integrando assim a incerteza sobre o modelo de substituição correto (Huelsenbeck *et al.* 2004, Ronquist *et al.* 2012). A análise foi feita com duas corridas independentes, usando 50.000.000 de gerações e amostragem a cada 5.000 gerações, um descarte do primeiro quarto (25%) da distribuição amostrada como burn-in e um stop value de 0.01

Para nortear futuras mudanças taxonômicas, foi realizada uma análise de delimitação de espécies por particionamento automático (ASAP) (Puillandre *et al.* 2021), utilizando apenas as sequências da região Barcode e com a opção de modelo de substituição Kimura (k80; Kimura 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

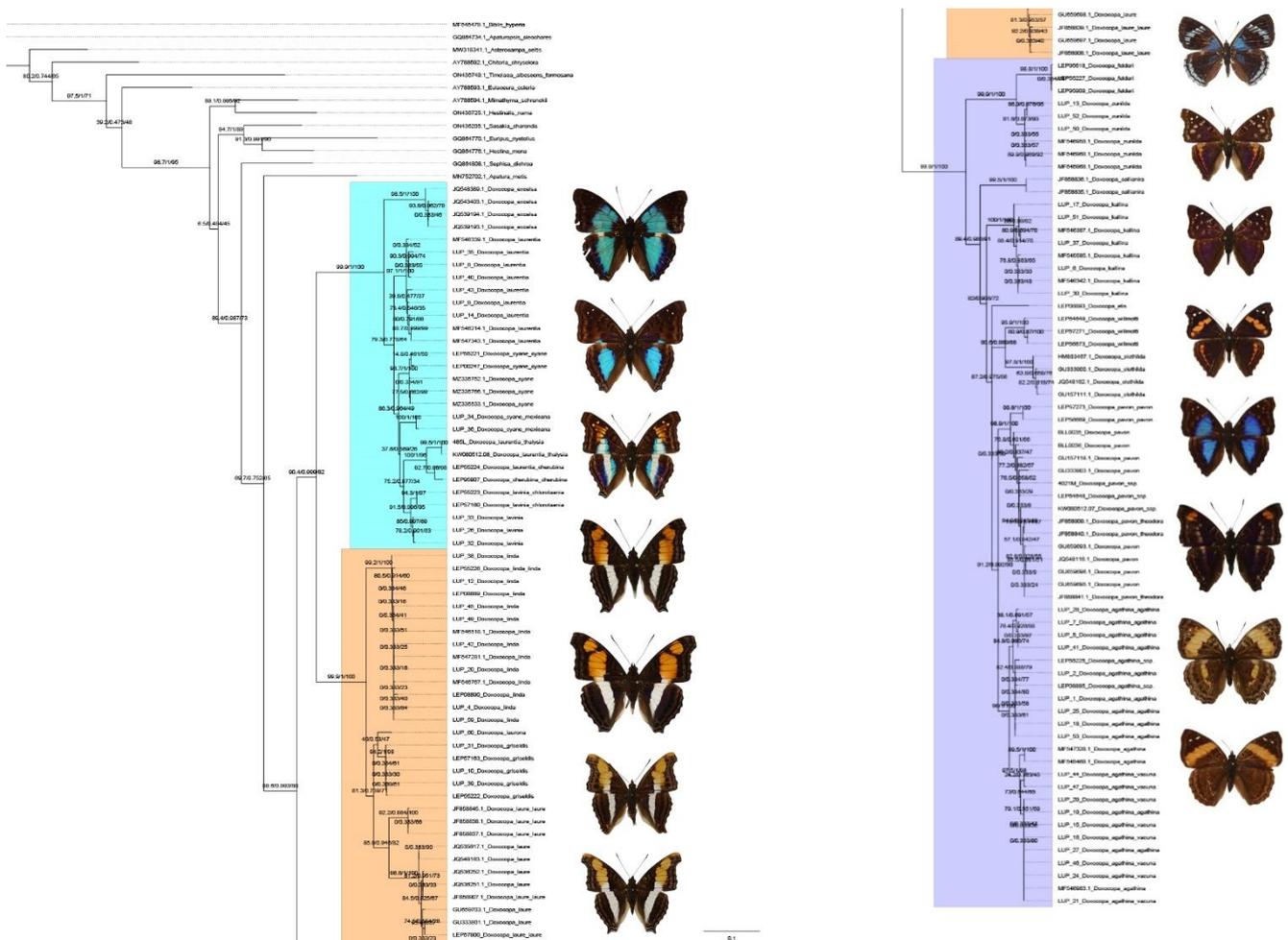


Fig.2. Árvore resultante da análise ML. Valores de suporte estão acima dos respectivos ramos. Grupos morfológicos (Bizarro 2002) destacados (*agathina* em roxo, *laure* em laranja e *laurentia* em azul)

As duas hipóteses filogenéticas geradas têm uma topologia similar, e recuperaram *Doxocopa* como um gênero monofilético, com valores moderado (ML) (bootstrap=88) e alto (Bayesiana) ($p=0.98$) e dão alto suporte a três dos quatro grupos morfológicos propostos por Bizarro 2002, mostrando que tal classificação morfológica reflete linhagens biológicas. A maior parte das espécies foi recuperada como monofilética e com suporte alto, exceto *Doxocopa cyane*, que foi recuperada como parafilética.

Na inferência Bs, *D. cyane* foi recuperada em uma politomia com *Doxocopa lavinia*, enquanto na análise ML uma de suas subespécies, *D. cyane mexicana*, é recuperada (ainda que sem suporte, bootstrap= 26) como grupo irmão de *D. lavinia* + *D. cherubina*. Esta última, foi recuperada como grupo irmão de *D. excelsa* na análise Bs, ainda que com sem suporte ($p=0.51$). A inferência Bs ainda compartilha uma politomia com a análise de ML, que é entre os clados formados por *D. elis*, *D. willmotti* + *D. clothilda* e *D. pavon* + *D. agathina*.

Na análise de delimitação de espécies (ASAP), a partição de maior score recupera 18 espécies em nossa amostragem de *Doxocopa*. De especial interesse são a recuperação de *Doxocopa clothilda* e da recém descrita *D. willmotti* (Benmesbah *et al.* 2018) como uma única espécie, a separação de *D. druryi acca* e *D. laure laure* em duas espécies, corroborando a hipótese de dela Maza Elvira & de la Maza Elvira 2022, e a união de *D. cyane burmeisteri* + *D. cyane cyane* com *D. lavinia* em uma única espécie, com *D. cyane mexicana* sendo recuperada como espécie irmã. Este último resultado é curioso, dada a grande incongruência morfológica entre *D. cyane* e *D. lavinia*, mas não de todo imprevisível, uma vez que há um híbrido putativo em coleções de museu (Bizarro 2002) e alta proximidade destas taxa nas hipóteses filogenéticas.

CONCLUSÕES:

As análises deste trabalho suportam o monofiletismo de *Doxocopa*, e começaram a resolver debates que persistiram por muito tempo acerca da taxonomia do grupo. A confirmação do monofiletismo de três dos quatro grupos morfológicos estabelecidas por Bizarro 2002 e o teste do estado de diversos taxa são passos importantes na direção da plena clareza taxonômica e sistemática para o gênero, e facilitam a utilização do gênero como modelo para pesquisas futuras. Ainda há, todavia, etapas a serem cumpridas: duas espécies de difícil amostragem, *D. thoe* e *D. zalmunna*, continuam sem representação na árvore. *Doxocopa thoe* em especial não tem grande afinidade morfológica com nenhuma outra espécie, sendo inclusive encaixada em um grupo morfológico à parte por Bizarro 2002, sendo sua posição, portanto, completamente incerta. Ademais, algumas espécies, como *D. callianira* e *D. excelsa*, também de difícil amostragem, estão representadas na análise por apenas um gene, apesar de terem seu monofiletismo claro e serem morfológicamente distintas. Logo, uma amostragem mais ampla, que incluísse tais taxa, auxiliaria na melhor resolução da árvore de *Doxocopa*. Ademais, a inclusão de mais marcadores moleculares também poderia ser um passo para clarear relações turvas (Wiens, 2006), como as dentre as espécies do clado *laurentia*. O presente trabalho apresenta a primeira hipótese filogenética de *Doxocopa*, com uma ampla amostragem, abrangendo grande parte das espécies e subespécies propostas para o gênero. Assim, os resultados aqui apresentados são de suma importância para elucidar as relações filogenéticas do gênero, organizar sua taxonomia e facilitar estudos futuros dos fenômenos ecológicos e evolutivos que envolvem *Doxocopa*.

BIBLIOGRAFIA

1. Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J. F., Dessimoz, C., & Gascuel, O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes.
2. Benmesbah, M., Costa, M., Attal, S., Vilorio, L. A. & Muriene, J. (2018). Descripción de una nueva especie del género *Doxocopa* Hübner, 1819, del Chocó ecuatoriano. *Tropical Lepidopterozoology Studies*, 6 (1), 7-19
3. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2005). *GenBank. Nucleic Acids Research*, 33 (DATABASE ISS.), 34–38. *Systematic Biology*, 60(5), 685-699.
4. Bizarro, J. M. S., Revisão do gênero *Doxocopa* Hübner [1819]. (2002). Unpublished
5. Boggs, C. L., Watt, W. B., & Ehrlich, P. R. (Eds.). (2003). *Butterflies: ecology and evolution taking flight*. University of Chicago Press.

6. Chazot, N., Condamine, F. L., Dudas, G., Peña, C., Kodandaramaiah, U., Matos-Maraví, P., ... & Wahlberg, N. (2021). Conserved ancestral tropical niche but different continental histories explain the latitudinal diversity gradient in brush-footed butterflies. *Nature communications*, 12(1), 5717.
7. de la Maza Elvira, R. G., & de la Maza Elvira, J. (2022). EL COMPLEJO DE ESPECIES “*Doxocopa alaura* (Drury, 1773)”, *sensu* Fabricius, (1775) EN MÉXICO (Nymphalidae-Apaturinae). *SOCIEDAD MEXICANA DE LEPIDOPTEROLOGÍA*, 93.
8. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.
9. Garzón-Orduña, I. J., Silva-Brandão, K. L., Willmott, K., Freitas, A. V., Wahlberg, N., & Brower, A. V. (2024). Wing pattern diversity in *Eunica* butterflies (Nymphalidae: Biblidinae): phylogenetic analysis implies decoupled adaptive trends in dorsal sexual dimorphism and ventral eyespot evolution. *Cladistics*, 40(1), 1-20.
10. Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321
11. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
12. Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*, 35 (2), 518- 522
13. Huelsenbeck, J. P., Larget, B., & Alfaro, M. E. (2004). Bayesian phylogenetic model selection using
14. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14 (6), 587-589.
15. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Molecular biology and evolution*, 21(6), 1123-1133.
16. Loeffler-Henry, K., & Sherratt, T. N. (2024). Selection for evasive mimicry imposed by an arthropod predator. *Biology Letters*, 20(1), 20230461..
17. Lamas, G. (2004). Atlas of Neotropical Lepidoptera. Checklist: Part 4A. Hesperioidea & Papilionoidea. Gainesville, Scientific Publishers, XXXVI+ 439p.
18. Nakahara, S., Barbosa, E. P., Nakamura, I., Lamas, G., & Freitas, A. V. (2021). Description of a new species of *Ypthimoides* Forster, 1964 from Peru (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae). *Tropical Lepidoptera Research*, 138-144.
19. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
20. Páez, E., Valkonen, J. K., Willmott, K. R., Matos-Maraví, P., Elias, M., & Mappes, J. (2021). Hard to catch experimental evidence supports evasive mimicry. *Proceedings of the Royal Society B*, 288 (1946), 20203052.
21. Patterson, J., Chamberlain, B., & Thayer, D. (2004). Finch TV Version 1.4. 0. Published by authors.
22. Pinheiro, C. E. G., & Freitas, A. V. L. (2014). Some possible cases of escape mimicry in Neotropical butterflies. *Neotropical Entomology*, 43, 393-398.
23. Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.
24. Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
25. Silva-Brandão, K. L., Santos, T. V., Côtoli, F. L., & Omoto, C. (2015). Genetic diversity and structure of Brazilian populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Implications for pest management. *Journal of Economic Entomology*, 108 (1), 307-316
26. Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2003). The role of phylogenetics in comparative genetics. *Plant physiology*, 132 (4), 1790-1800.
27. Wahlberg, N., Leneveu, J., Kodandaramaiah, U., Peña, C., Nylin, S., Freitas, A. V., & Brower, A. V. (2009). Nymphalid butterflies diversify following near demise at the Cretaceous / Tertiary boundary. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1677), 4295-4302.
28. 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), 231-42.
29. Warren, A. D., K. J. Davis, E. M. Stangeland, J. P. Pelham, K. R. Willmott & N. V. Grishin. (2023). Illustrated Lists of American Butterflies
30. Wiens, J. J. (2006). Missing data and the design of phylogenetic analyses. *Journal of biomedical informatics*, 39(1), 34-42.