

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Projeto de Mestrado

CONTRIBUIÇÃO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES NA ELUCIDAÇÃO DA SISTEMÁTICA DE
AMBULYCINI (LEPIDOPTERA, SPHINGIDAE, SMERINTHINAE)

Aluno: Lucas Waldvogel Cardoso

Orientador: Marcelo Duarte

São Paulo

Resumo

A esfingofauna brasileira ainda hoje é pouco conhecida. *Orecta lycidas* tem sido considerada uma espécie rara e pertence à tribo Ambulycini, da subfamília Smerinthinae. Com o intuito de entender a sua fraca representação em museus e em localidades amostradas sistematicamente ao longo das duas últimas décadas, serão realizados estudos filogenéticos e moleculares para responder duas perguntas: como *O. lycidas* se relaciona filogeneticamente dentro da tribo Ambulycini? Como a estrutura genética de táxons relacionados varia no tempo e no espaço? Neste trabalho, populações de *Adhemarius eurysthene*s serão analisadas filogeograficamente para a obtenção das informações sobre a estrutura e a variabilidade genética. Para o estabelecimento de uma hipótese filogenética, dados morfológicos e moleculares serão analisados no estudo de representantes dos quatro gêneros que compõem o clado neotropical da tribo Ambulycini.

1. Introdução

1.1. Sphingidae

Esfingídeos compreendem um dos grupos mais conspícuos e bem estudados da ordem Lepidoptera (Kawahara *et al.*, 2009). Devido ao que se tem descoberto sobre sua importância ecológica como polinizadores e pragas, além de serem comumente coletados em armadilhas luminosas e de seu tamanho e forma facilitarem a identificação e a manipulação de amostras, esfingídeos são importantes modelos para estudos em diversas áreas da Biologia. São encontrados no mundo inteiro, exceto na Antártida e Groenlândia (Moré *et al.*, 2005). Em geral, os adultos apresentam porte avantajado e são facilmente atraídos pela luz artificial. Podem ser diurnos, crepusculares ou noturnos, porém, na América do Sul, as espécies diurnas são menos comuns que aquelas do Velho Mundo (Moré *et al.*, 2005). Na região neotropical, a maioria das espécies pode ser atraída e coletada à noite, quando estão ativas geralmente alimentando-se do néctar de flores esfingófilas (Kitching & Cadiou, 2000). As lagartas costumam ser grandes e de coloração vistosa; quando perturbadas, apresentam um comportamento que lhes dá a forma assemelhada de uma esfinge egípcia (Moré *et al.*, 2005). A família apresenta cerca de 200 gêneros e 1300 espécies (Kitching & Cadiou, 2000), com aproximadamente um terço dos táxons registrados para a região neotropical (Heppner, 1991, 1998). Para o Brasil, são conhecidos 29 gêneros e 210 espécies (Duarte *et al.*, 2012).

Com base em dados morfológicos, alguns autores (e.g. Minet, 1994; Carcasson & Heppner, 1996; Lemaire & Minet, 1998; Kitching & Cadiou, 2000) classificam os Sphingidae em três subfamílias: Macroglossinae, Sphinginae e Smerinthinae. Dados moleculares de cinco

genes nucleares corroboram o monofiletismo das duas primeiras, mas não de Smerinthinae (ver Fig. 1) (Kawahara *et al.*, 2009). De acordo com a classificação de Kitching & Cadiou (2000), Smerinthinae está dividida em três tribos, sendo que somente a tribo Ambulycini possui representantes da fauna brasileira.

O monofiletismo de Ambulycini está fortemente sustentado por caracteres moleculares (Kawahara *et al.*, 2009). A filogenia de Kawahara *et al.* (op. cit.) evidenciou a separação entre os gêneros neotropicais e os do Velho Mundo (Fig. 1). Porém, os autores usaram apenas duas espécies de dois gêneros neotropicais (*Adhemarius* Oiticica, 1939 e *Protambulyx* Rothschild & Jordan, 1903) em suas análises. Assim, novos estudos que incluam os demais gêneros neotropicais de Ambulycini (*Orecta* Rothschild & Jordan, 1903 e *Trogolegnum* Rothschild & Jordan, 1903), e mais terminais dentro de cada gênero, são necessários para o melhor embasamento das hipóteses sobre os relacionamentos entre os gêneros e sobre o próprio monofiletismo da tribo.

Ainda pouca informação sobre os esfingídeos de São Paulo encontra-se disponível na literatura. Duarte *et al.* (2008) publicaram a lista mais extensa de esfingídeos para uma localidade deste Estado (Estação Biológica de Boracéia, município de Salesópolis), fruto de coletas realizadas entre 1940 e 2004. Neste trabalho, Smerinthinae foi a subfamília com menor número de táxons amostrados, correspondendo a 11% do material coletado (Duarte *et al.*, 2008). Ambulycini teve um total de sete espécies registradas, sendo duas de *Protambulyx* e cinco de *Adhemarius*. Entre as espécies mais frequentes da tribo, *A. eurysthenes* (R. Felder, [1874]) foi coletada ao longo de todos os meses do ano e *A. gannascus* (Stoll, 1790) só não foi coletada no mês de maio. Curiosamente, também em 2008, ano em que esta lista de esfingídeos foi publicada, dois alunos em expedição feita à mesma Estação, durante a disciplina optativa “Entomologia de Campo” (ministrada pelo Dr. Marcelo Duarte), coletaram um exemplar de *Orecta lycidas* (Boisduval, [1875]), que, até então, não tinha registro para a localidade no acervo da coleção de Lepidoptera do MZUSP.

Orecta lycidas parece ser uma espécie com populações restritas e de tamanho reduzido (M. Duarte, dados não publicados provenientes de acervos nacionais e internacionais). Para o Brasil, têm-se alguns poucos registros para as regiões sudeste e sul (RJ, SP, PR, SC, RS) do que se considera a subespécie *O. l. lycidas*; o registro para o Estado de Goiás (um único exemplar no acervo da UFPR) ainda é duvidoso. No Estado de São Paulo, por estar presente em menos de cinco localidades e não ter mais que 50 indivíduos amostrados em cada localidade, foi considerada como quase ameaçada conforme as categorias da IUCN (Lista da Fauna Ameaçada de Extinção do Estado de São Paulo - documento em elaboração).

1.2. Estudos moleculares

Marcadores moleculares são amplamente utilizados para estimar características populacionais e demográficas tais como migração, conectividade e fluxo gênico, além de ajudarem na identificação dos padrões que organizam a biodiversidade (Freeland, 2006; Johnson *et al.*, 2009). Por meio desses marcadores, pode-se estudar a distribuição da variabilidade genotípica entre populações (Bereczki *et al.*, 2005; Pecsénye *et al.*, 2007). Adicionalmente, a genética de populações, combinada à filogenia de genes, tem permitido a investigação de táxons e grupo de táxons intimamente relacionados, favorecendo a descoberta dos mecanismos de especiação atuantes (Vogler & Monaghan, 2006). Análises filogeográficas, por sua vez, podem elucidar questões sobre a distribuição geográfica das linhagens evolutivas, dando pistas sobre os padrões históricos de dispersão, adaptação local e especiação (Avise, 2000). Com os dados sobre a disposição geográfica de linhagens genéticas e a distribuição da variabilidade a elas associada podemos incluir o tempo e o espaço em análises de populações (Freeland, 2006).

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta características que o distinguem como uma ferramenta particularmente útil para estudos filogeográficos e filogenéticos. Por sua fácil amplificação e sequenciamento, alta taxa de mutações, arranjo conservado dos genes, herança quase exclusivamente materna, com raros casos de heteroplasmia e “*paternal leakage*” (Avise, 2000), e a ausência de recombinação, o mtDNA permite identificar linhagens genéticas de modo mais eficiente que o DNA nuclear (nDNA) (Freeland, 2006). A região anterior do gene codificador da subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase (COI) foi proposta por Hebert *et al.* (2003a, b) como um código de barras para a identificação de espécies animais e tem sido bastante utilizada para estudos de filogenia e filogeografia em Lepidoptera (Silva-Brandão *et al.*, 2009). Utilizando marcadores de outras partes do genoma, como, por exemplo, do DNA nuclear, pode-se aumentar o suporte das hipóteses filogenéticas. Por fim, a compilação dos dados obtidos de vários marcadores pode fornecer pistas sobre a história evolutiva das espécies estudadas (Hare, 2001; Brito & Edwards, 2009; McCormack *et al.*, 2009).

1.3. Justificativa

Considerando que *O. lycidas* possa ser confirmada como um táxon ameaçado de extinção pelos impactos antrópicos em suas populações restritas e de tamanho reduzido, torna-se fundamental compreender o relacionamento filogenético dessa espécie com os demais táxons do clado neotropical de Ambulycini. Nesse sentido, hipóteses filogenéticas com base na análise de caracteres morfológicos de algumas espécies pertencentes ao clado,

além de outras que representarão o restante da tribo são imprescindíveis. Dados moleculares, acessíveis apenas para os terminais do clado neotropical, serão combinados aos dados morfológicos na construção de hipóteses que considerem apenas as espécies coletadas em campo.

Adhemarius eurysthenes tem sido coletada todos os meses do ano na Estação Biológica da Boracéia, padrão que esperamos encontrar em outras localidades de sua ocorrência. Assim, será realizado um estudo filogeográfico de *A. eurysthenes*, visto que esta espécie tem distribuição geográfica muito semelhante àquela verificada em *O. lycidas*. Além disso, tratando-se de gêneros próximos, provavelmente *A. eurysthenes* e *O. lycidas* apresentam um padrão de estruturação genética parecido. Com base nessas premissas, levantar dados sobre a estrutura e a variabilidade genética de táxons próximos, a partir de diferentes populações, permitirá que ações futuras para conservação de *O. lycidas* possam levar em conta como linhagens genéticas dessa e/ou de outras espécies de Ambulycini estruturam-se no espaço e no tempo.

2. Objetivos

- Testar o monofiletismo dos Ambulycini neotropicais (Sphingidae, Smerinthinae), com base em caracteres morfológicos e moleculares;
- Testar o monofiletismo dos gêneros arrolados no clado neotropical de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae) com base em caracteres morfológicos e moleculares;
- Estabelecer os relacionamentos de parentesco entre os gêneros neotropicais de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae);
- Analisar a estrutura e a variabilidade genética de populações de *Adhemarius eurysthenes* registradas em território brasileiro e, de posse desses dados, entender os padrões de distribuição e evolução da espécie, subsidiando ideias que possam contribuir para a conservação de *Orecta lycidas* e outras espécies ameaçadas de extinção dentro de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae).

3. Material e Métodos

3.1. Coleta do material

Parte do material para o desenvolvimento do presente projeto será proveniente das expedições que estão sendo realizadas pela equipe do Laboratório de Lepidoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) (ver também Tabela 1 para as localidades selecionadas para amostragem de *A. eurysthenes*, com $n \geq 10$

exemplares/localidade), em localidades da região sudeste do Brasil. Outras localidades brasileiras também serão amostradas com auxílio das equipes regionais participantes do projeto Sisbiota/ Lepidoptera (CNPq – processo número 563332/2010-7). Material de localidades da América Central e de outros países da América do Sul poderá ser obtido por meio de colaborações com especialistas trabalhando nessas áreas.

Além do material depositado no Museu de Zoologia da USP, outras coleções (ver lista abaixo) serão consultadas para estudo do maior número possível de exemplares da tribo Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae).

BMNH	British Museum of Natural History, Londres (Sr. Martin Honey).
DZUP	Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil (Drs. Olaf H. H. Mielke e Mirna M. Casagrande).
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM (Dra. Catarina Motta).
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA (Dr. William Leslie Overal).
FIOC	Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Dra. Jane Costa).
MIZA	Museo del Instituto de Zoologia Agrícola Francisco Fernández Yépez, Maracay, Venezuela (Dr. José Clavijo A.).
MNRJ	Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Dr. Miguel A. Monné Barrios).
MUSM	Museo de Historia Natural de la Universidad de San Marcos, Lima, Peru (Dr. Gerardo Lamas).
USNM	Department of Entomology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, EUA (Dr. Robert K. Robbins).
VOB	Coleção particular do Dr. Vitor Osmar Becker, Camacan, Bahia, Brasil (Dr. Vitor O. Becker).
ZUEC	Museu de Zoologia Prof. Adão José Cardoso, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil (Dr. André V. L. Freitas).

3.2. *Dados morfológicos*

Serão levantados caracteres da morfologia externa e das genitálias para estudo das relações filogenéticas dentro do clado neotropical da tribo Ambulycini. Será realizada, quando possível, a dissecação de pelo menos três exemplares de cada sexo, incluindo as espécies do grupo externo. As genitálias serão dissecadas seguindo os protocolos-padrão de fervura em

solução de hidróxido de potássio a 10% (Ehrlich & Ehrlich, 1961), para o amolecimento dos tecidos e clarificação do exoesqueleto. Caracteres da estrutura externa do tórax e aqueles relacionados ao padrão de coloração das asas serão estudados diretamente ao estereomicroscópio.

Outra metodologia será a busca de caracteres da morfologia externa utilizados na literatura. Pesquisas bibliográficas para o levantamento de trabalhos de filogenia baseada em caracteres morfológicos conduzirão ao maior número possível de caracteres para a construção da matriz.

3.3. Dados moleculares

Para as análises filogenéticas dos gêneros neotropicais de Ambulycini serão estudados três genes, sendo dois pertencentes ao nDNA (CAD e *wgl*) e um do mtDNA (COI). Todo o material genético será extraído das pernas de cada indivíduo. Para tanto, ao menos um desses apêndices será destacado dos exemplares durante a coleta e acondicionado em frascos contendo tampão DMSO (Feinstein, 2004) ou álcool absoluto (Etanol 99,8%). Após a extração do DNA genômico, será amplificada a extremidade 5' do gene COI e os fragmentos dos genes nucleares CAD e *wgl*.

As reações de amplificação serão padronizadas tendo como base os protocolos descritos em Silva-Brandão *et al.* (2005) para o COI e Whalberg & Wheat (2008) para os fragmentos do CAD e *wlg*.

Após a amplificação e purificação de cada região, elas serão sequenciadas utilizando o mesmo conjunto de inicializadores usados para amplificação. Para o estudo filogeográfico de *Adhemarius eurysthenes* será sequenciada a extremidade 5' do gene mitocondrial COI. As sequências serão analisadas e alinhadas a olho e serão depositadas no GenBank.

3.4. Análises filogenéticas

Serão escolhidos para formação do grupo interno todas as oito espécies do gênero *Protambulyx*, todas as quatro do gênero *Orecta* e a única espécie do gênero *Trogolegnum*. *Adhemarius* possui treze espécies, mas a sua taxonomia ainda é mal resolvida. Por esse motivo e por serem as mais facilmente acessadas para os estudos morfológicos, serão incluídas como grupo interno apenas as seis espécies de *Adhemarius* representadas na coleção do MZUSP. Desse modo, os terminais que comporão as análises filogenéticas estão indicados na Tabela 2. *Ambulyx schauffelbergi* e *Amplipterus panopus* serão o grupo externo para as análises.

Os dados levantados durante o estudo da morfologia dos adultos serão transpostos em uma matriz. A análise da matriz de dados será realizada por meio de busca heurística, com o

método de biseção e reconexão de árvores. Após a busca heurística com pesos iguais, haverá uma nova busca com pesagem implícita (Goloboff, 1993) e outra com pesagem sucessiva (Farris, 1969). Na comparação com o grupo externo será feito o enraizamento a posteriori, de acordo com a proposta de Nixon & Carpenter (1993).

Dados morfológicos e moleculares serão combinados para outras análises filogenéticas, usando Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Uma árvore de consenso estrito será feita sempre que houver mais de uma árvore parcimoniosa. A estabilidade dos ramos será determinada através do procedimento de bootstrap não-paramétrico (Felsenstein, 1985). Os índices de consistência e retenção serão calculados. Será determinado o suporte particionado de Bremer (1994) para cada uma das regiões sequenciadas e para os caracteres morfológicos.

Será determinado o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explica o padrão de cada região de DNA. A consistência dos ramos será estimada pelo procedimento de bootstrap não-paramétrico (Felsenstein, 1985). A análise de Inferência Bayesiana será aplicada e a consistência dos ramos será estimada dessa vez pelo procedimento de Probabilidade Posterior dos ramos.

3.5. Análise filogeográfica

Uma rede de haplótipos do mtDNA COI para *A. eurysthenes* será inferida. A partir da rede de haplótipos é possível presumir o haplótipo ancestral e, ao correlacioná-los com a sua localização geográfica, pode-se inferir possíveis formas de dispersão da espécie no passado. A relação entre os indivíduos de *A. eurysthenes* será estimada por uma análise fenética de distância.

A divergência entre e dentro de cada localidade amostrada será comparada por uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Também serão calculados os valores de variação genética par a par entre as localidades, usando o mesmo programa.

4. Cronograma de atividades

As atividades propostas estão organizadas conforme o quadro a seguir.

Quadro 1. Cronograma de atividades a serem desenvolvidas ao longo do projeto, entre o segundo semestre de 2012 e o primeiro semestre de 2014.

Atividades \ Período	2012	2013		2014
	out - dez	jan – jun	jul - dez	jan – set
Obtenção de créditos em disciplinas	X	X	X	
Levantamento de indivíduos em campo e em museus	X	X	X	
Estudos morfológicos	X	X	X	
Análise filogenética		X	X	X
Coleta dos dados moleculares	X	X	X	
Análise dos dados moleculares		X	X	X
Compilação dos dados e dissertação				X
Entrega da dissertação				X

5. Resultados

5.1. Levantamento do material

Três dos oito pontos estipulados para a coleta de exemplares de *Adhemarius eurysthenes* foram integralmente amostrados (Tab.3). Outro ponto possui quatro indivíduos coletados e, portanto, nova coleta será feita para se alcançar o número mínimo de dez indivíduos. Juntamente foram coletados exemplares das outras espécies neotropicais da tribo e foi retirado material para futuras extrações de DNA. A Tabela 4 mostra o número de amostras por espécie neotropical coletada além de *A. eurysthenes*. Estas amostras constituirão os dados moleculares para o estudo filogenético.

Foram obtidos, através de empréstimo, vinte e nove exemplares de nove espécies pertencentes à tribo Ambulycini (Tab.5). Todos os exemplares foram fotografados, porém as imagens ainda não foram tratadas para a confecção das pranchas. Além destes, novos exemplares da tribo foram adquiridos para a coleção do MZUSP, montados e integrarão os estudos propostos.

5.2. Obtenção dos dados moleculares

Foi extraído o DNA de 57 exemplares de *Adhemarius eurysthenes* coletados até o momento. Um fragmento do gene COI e o gene *wgl* foram amplificados e estão sendo purificados para o sequenciamento (Fig.2). O fragmento do gene CAD foi amplificado para alguns indivíduos, sendo que o restante está em vias de amplificação.

5.3. *Obtenção dos dados morfológicos*

Foram levantados quatro caracteres morfológicos a partir da análise do abdômen de sete espécies de *Adhemarius* (Tab.6A). Além destes, outros sete caracteres obtidos da literatura compõem a lista dos caracteres preliminares (Tab.6B) e serão revisados antes da construção da primeira matriz.

Vinte genitálias de dez espécies dentre aquelas encontradas na coleção do MZUSP foram dissecadas, mas ainda não foram analisadas (Tab.7). Foram também completamente dissecados quatro indivíduos de quatro espécies diferentes: *A. gannascus*, *A. daphne*, *P. strigilis*, *P. eurycles*, na busca por caracteres encobertos por escamas.

5.4. *Produção bibliográfica*

Há um artigo em andamento para a descrição do primeiro instar larval e do ovo da espécie atualmente considerada dentro da lista de animais ameaçados de extinção para o Estado de São Paulo, *Orecta lycidas lycidas*, resultantes da doação de seis ovos e uma fêmea coletados em Ponta Grossa, PR, para a coleção do MZUSP. Atualmente se conhece apenas superficialmente um pouco do ciclo de vida, um estágio larval e a pupa dessa espécie, coletados em Minas Gerais e descritos por Zikan (1928).

Referências

- Awise, J. C. 2000. **Phylogeography. The history and formation of species.** Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Berezki, J., Pecsénye, K., Peregovits, L., & Varga, Z. 2005. Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43:157-165.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10:295-304.
- Brito, P. H., & Edwards, S. V. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135:439-55.
- Carcasson, R. H. and Heppner, J. B. 1996. Sphingoidea, Sphingidae, pp. 50-62 *In* J. B. Heppner (ed.). Atlas of Neotropical Lepidoptera. *Checklist: Part 4B*. Drepanoidea - Bombycoidea - Sphingoidea. Association for Tropical Lepidoptera, Gainesville.

- Duarte, M., Carlin, L. F. & Marconato, G. 2008. Light attracted hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae) of Boracéia, municipality of Salesópolis, state of São Paulo, Brazil. *Checklist* 4(2):123-136.
- Duarte, M., Specht, A., Marconato, G. & Casagrande, M. M. 2012. Lepidoptera, pp. 625-682. *In: Rafael, J. A.; G. A. R. Melo; C. J. B. Carvalho; S. A. Casari & R. Constantino (Eds.). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Holos Editora. Ribeirão Preto. 796 pp.
- Ehrlich, P. R., Ehrlich, A. H. 1961. **How to know the butterflies**. Dubuque, Wm. C. Brown Company Publishers, VIII + 266 pp.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Farris, J. S. 1969. A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology* 18:374-385.
- Feinstein, J. 2004. DNA sequence from butterfly frass and exuviae. *Conservation Genetics* 5:103-104.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Freeland, J. R. 2006. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England. 388 pp.
- Goloboff, P. A. 1993. *NONA v. 2.0: A Tree Searching Program*. Programa e documentação. Publicado pelo autor. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod>.
- Hare, M. P. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution* 16:700-706.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270:313-321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270:596-599.

- Heppner, J. B. 1991. Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. *Tropical Lepidoptera* 2(suppl.1):1-85.
- Heppner, J. B. 1998. Classification of Lepidoptera. Part 1. Introduction. *Holarctic Lepidoptera* 5(suppl.1):1-148.
- Johnson, B. J., Scott, M. P., & Adams, B. J. 2009. Where's the ecology in molecular ecology? *Oikos* 118:1601-1609.
- Kawahara, A. Y., Mignault, A. A., Regier, J. C., Kitching, I. J., & Mitter, C. 2009. Phylogeny and biogeography of hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): evidence from five nuclear genes. *PLoS ONE* 4:e5719.
- Kitching, I. J. & Cadiou, J. M. 2000. **Hawkmoths of the world: an annotated and illustrated revisionary checklist (Lepidoptera: Sphingidae)**. Cornell University Press, Ithaca. 226 pp.
- Kitching, I. J. 2002. The phylogenetic relationships of Morgan's Sphinx, *Xanthopan morgani* (Walker), the tribe Acherontiini, and allied long-tongued hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae, Sphinginae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 135:471-527.
- Kitching, I. J. 2003. Phylogeny of the death's head hawkmoths, *Acherontia* [Laspeyres], and related genera (Lepidoptera: Sphingidae: Sphinginae: Acherontiini). *Systematic Entomology* 28:71-88.
- Lemaire, C. & Minet, J. 1998. The Bombycoidea and their relatives; pp. 321-353 In N. P. Kristensen (ed.), Band/Volume IV. **Arthropoda: Insecta. Lepidoptera, moths and butterflies: evolution, systematics, and biogeography**. Vol. 1. In M. Fisher (ed.). *Handbuch der Zoologie/Handbook of Zoology*. Berlin, Walter de Gruyter.
- McCormack, J. E., Huang, H., & Knowles, L. L. 2009. Maximum likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic Biology* 58:501-508.
- Minet, J. 1994. The Bombycoidea: phylogeny and higher classification (Lepidoptera: Glossata). *Entomologica Scandinavica* 25(1):63-88.

- Moré, M., Kitching, I. J., & Cocucci, A. A. 2005. **Sphingidae: Esfingídeos de Argentina. Hawkmoths of Argentina.** Buenos Aires: L.O.L.A. (Literature of Latin America). 184 pp.
- Nixon, C. K. & Carpenter, J. M. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9:413-426.
- Pecsenye, K., Bereczki, J., Tihanyi, B., Toth, A., Peregovits, L., & Varga, Z. 2007. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera: Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 91:11-21.
- Silva-Brandão, K. L., Freitas, A. V. L., Brower, A. V. Z., & Solferini, V. N. 2005. Phylogenetic relationships of the New World Troidini swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) based on COI, COII, and EF-1 alpha genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:468-483.
- Silva-Brandão, K. L., Lyra, M. L., & Freitas, A. V. L. 2009. Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical Entomology* 38:441-451.
- Vogler, A. P., & Monaghan, M. T. 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45:1-10.
- Wahlberg, N., & Wheat, C. W. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* 57:231-242.
- Zikan, J. F. 1928. Zur Biologie von *Orecta lycidas* Boisd. und *Chlaenogramma muscosa* Jones. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina* 2:95-98.

Anexos

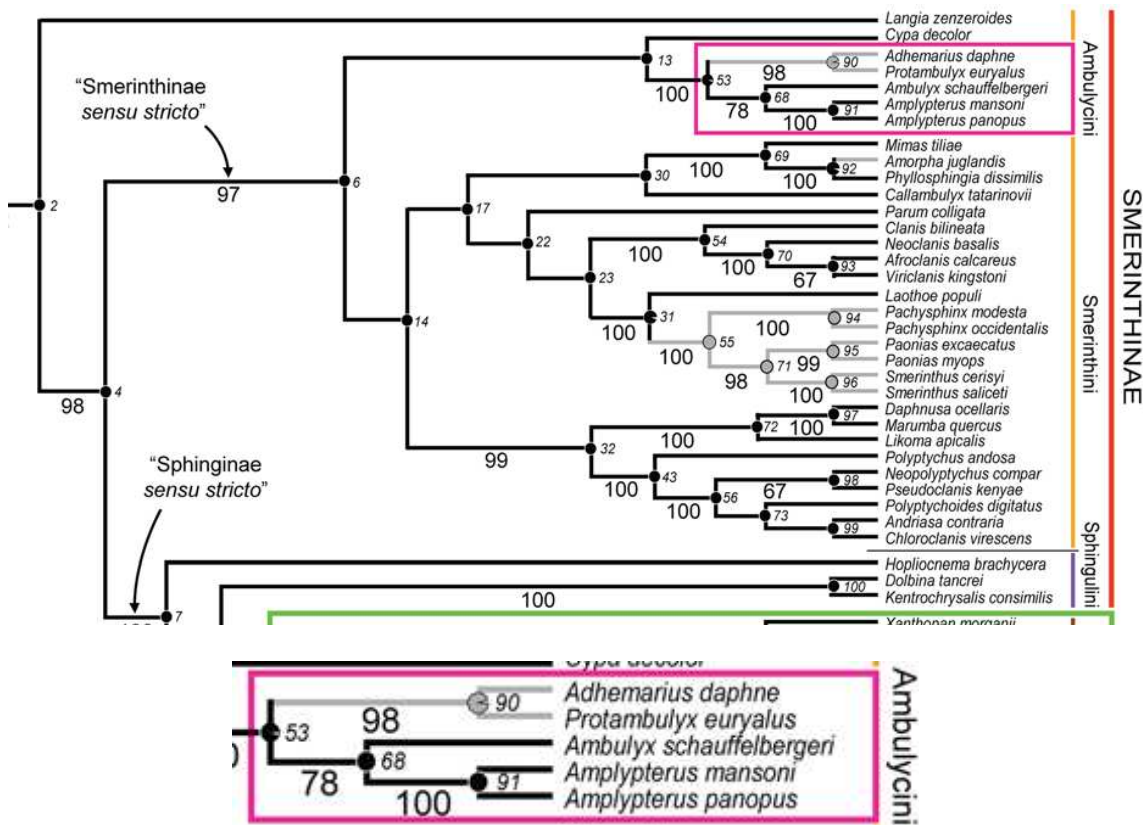


Figura 1. Detalhe da filogenia de "Smerinthinae" e Ambulycini construída a partir de dados moleculares; modificado de Kawahara *et al.* 2009.

Tabela 1. Localidades pré-selecionadas para a amostragem de *Adhemarius eurysthenes*.

Estado	Reserva
Espírito Santo	- Reserva Biológica Augusto Ruschi
Rio de Janeiro	- Parque Nacional da Serra dos Órgãos
São Paulo	- Estação Biológica da Boracéia
	- Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi
	- Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba
	- Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Santa Virgínia)
Paraná	- Parque Estadual da Serra da Graciosa
Santa Catarina	- Parque Nacional da Serra do Itajaí

Tabela 2. Gêneros e espécies a serem incluídas na matriz de dados morfológicos.

	Gênero	Espécies para estudo
Grupo interno	<p><i>Adhemarius</i> Oiticica, 1939 (13 espécies válidas)</p>	<p><i>A. daphne</i> <i>A. eurysthene</i> <i>A. gagarini</i> <i>A. gannascus</i> <i>A. palmeri</i> <i>A. tigrina</i></p>
	<p><i>Protambulyx</i> Rothschild & Jordan, 1903 (8 espécies válidas)</p>	<p><i>P. astygonus</i> <i>P. carteri</i> <i>P. euryalus</i> <i>P. eurycles</i> <i>P. goeldii</i> <i>P. ockendeni</i> <i>P. strigilis</i> <i>P. sulphurea</i></p>
	<p><i>Orecta</i> Rothschild & Jordan, 1903 (4 espécies válidas)</p>	<p><i>O. acuminata</i> <i>O. fruhstorferi</i> <i>O. lycidas</i> <i>O. venedictoffea</i></p>
	<p><i>Trogolegnum</i> Rothschild & Jordan, 1903 (1 espécie válida)</p>	<p><i>T. pseudambulyx</i></p>
Grupo externo	<p><i>Ambulyx</i> Westwood, 1847</p>	<p><i>A. schauffelbergeri</i></p>
	<p><i>Amplipterus</i> Hübner, 1819</p>	<p><i>A. panopus</i></p>

Tabela 3. Número de indivíduos de *A. eurysthenes* coletados por localidade de coleta

Ponto/Localidade	Número de indivíduos coletados (≥ 10)
Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi – SP	17
Estação Biológica da Boracéia - SP	20
Parque Estadual da Serra do Mar - SP	-
Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – SP	-
Parque Nacional da Serra dos Órgãos - RJ	4
Reserva Biológica Augusto Ruschi - ES	16
Parque Estadual da Graciosa - PR	-
Parque Nacional da Serra do Itajaí - SC	-

Tabela 4. Número de amostras geradas por espécie neotropical coletada, desconsiderando *A. eurysthenes*.

Espécie coletada	Número de amostras
<i>Adhemarius daphne</i>	5
<i>A. gannascus</i>	8
<i>A. palmeri</i>	2
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	4
<i>Protambulyx eurycles</i>	3
<i>P. strigilis</i>	10

Tabela 5. Exemplos emprestados para comporem as análises

Espécie (número de indivíduos)	Origem do empréstimo
<i>Adhemarius palmeri</i> (4)	MNHN e ZSM
<i>A. tigrina</i> (4)	MNHN e ZSM
<i>Protambulyx astygonus</i> (1)	ZSM
<i>P. carteri</i> (2)	MNHN
<i>P. euryalus</i> (3)	ZSM
<i>P. eurycles</i> (2)	MNHN
<i>P. goeldii</i> (2)	MNHN e ZSM
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i> (1)	ZSM
<i>Ambulyx pryeri</i> (1)	MNHN
<i>A. schauffelbergeri</i> (4)	MNHN e ZSM
<i>A. substrigilis</i> (1)	MNHN
<i>Amplipterus panopus</i> (4)	MNHN e ZSM

Tabela 6. Caracteres preliminaresA. Caracteres levantados das espécies do gênero *Adhemarius*

Caracter	Número de estados
Coloração do oitavo tergito abdominal nos machos	2
Pequena mancha mediana do terceiro ao sexto tergito abdominal	3
Coloração do primeiro tergito abdominal	2
Coloração da parte ventral do abdômen	2

B. Caracteres levantados e adaptados da literatura

Região do corpo	Caracter
Cabeça	Disposição das escamas do segundo segmento do palpo labial
	Forma do ápice da probóscide
Tórax	Padrão de coloração do tórax
Pernas	Esporões das pernas medianas e posteriores modificados em espinhos
	Formato do pulvilo
	Formato dos tarsômeros
Asas	Recorte da asa anterior

Tabela 7. Genitálias dissecadas

Espécie	Macho	Fêmea
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	2	1
<i>A. daphne daphne</i>	1	1
<i>A. gagarini</i>	1	-
<i>A. gannascus</i>	1	1
<i>A. palmeri</i>	1	1
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	1	1
<i>Protambulyx astygonus</i>	1	2
<i>P. euryalus</i>	1	-
<i>P. eurycles</i>	1	1
<i>P. strigilis</i>	1	1

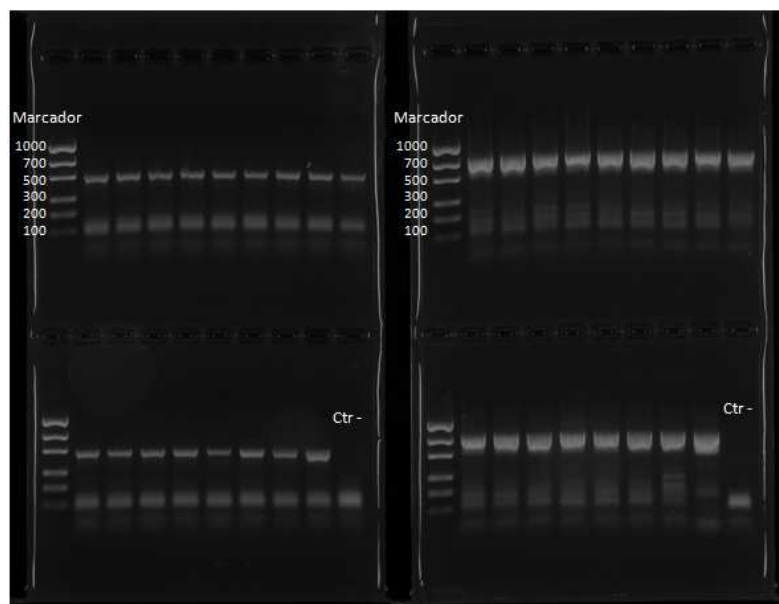


Figura 2. À esquerda, gel de agarose com marcador de tamanho (MassRuler Express LR Forward DNA Ladder) e os produtos de uma PCR para o gene *wingless* (*wgl*); à direita, gel usando o mesmo marcador e com os produtos de uma PCR para a sequência Barcode (COI). Números ao lado das bandas dos marcadores correspondem ao tamanho do DNA dessas bandas, em pares de bases (pb); Ctr -: controle negativo da reação.