



KIM RIBEIRO BARÃO

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DIVERSIDADE
MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM *Philaethria wernickei* (RÖBER, 1906)
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Prof. Dr. Gilson R. P. Moreira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2011

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E
GENÉTICA EM *Philaethria wernickei* (RÖBER, 1906)

(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

KIM RIBEIRO BARÃO

Aprovada em:

Prof. Dr. Taran Grant

Prof. Dr. Luiz Alexandre Campos

Dr. Augusto Ferrari

Dedico este trabalho ao meu avô Barão,

in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gilson Moreira, pelo incentivo e entusiasmo ao longo do mestrado, e profissionalismo, paciência e dedicação a cada dia de trabalho.

Ao Prof. Dr. Olaf Mielke pelo acolhimento em Curitiba, co-orientação, diversos momentos de discussão e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcus Kronforst por me acolher em Cambridge/EUA, pelas oportunidades e ensinamentos.

À Ms. Gislene Gonçalves, pelos ensinamentos, paciência e apoio ao longo de todo desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (UFRGS), Ábner Campos, Ana Kristina Silva, Bruna Ramos, Carolina Millán, Danessa Boligon, Darli Massardo, Deise Wotrich, Denis Silva e Sabrina Thiele, pela convivência amigável, constantes discussões e momentos de descontração.

Aos colegas Augusto Ferrari, Luciana Weiler, Luciano Moura e aos demais colegas do Laboratório de Entomologia Sistemática (UFRGS), sempre dispostos a discutir e agregar.

Aos demais colegas e professores do PPG Biologia Animal, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

À Profa. Dra. Mirna Casagrande, pelo carinho e incentivo, e aos colegas do Laboratório de Lepidoptera Neotropical (UFPR), em especial a Diego Dolibaina e Eduardo Carneiro, pelas coletas, trocas de experiências e companheirismo.

À colega Patrícia Silva (UFOPA), pela coleta de borboletas no Pará e pelo intercâmbio cultural.

Ao Prof. Dr. Gilberto Albuquerque (UENF), pelas trocas de experiências e auxílio em campo no Espírito Santo e Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. Marcelo Duarte e à Ms. Livia Pinheiro (USP), pela viabilização e organização de coleta na Estação Biológica de Boracéia.

Aos curadores das coleções científicas mencionadas no item “Material e Métodos”, por acesso ao material que viabilizou esta dissertação.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS), pelo auxílio na utilização dos equipamentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pela concessão de bolsa e licença de coleta, respectivamente.

Aos meus pais, Marcia e Gustavo, e à minha irmã, Giulia, pela compreensão nos meus momentos de ausência e por sempre me incentivarem a perseguir meus sonhos e objetivos.

À minha família, que desde pequeno me estimulou a olhar e ver a natureza.

Aos amigos, Anita Machado, Adriana Jeckel, Anelise Santos, Camila Jaeger, Clarissa Alminhana, David Freitas, Felipe Franco, Karen Limberger, Laura Nery, Lauren Bertholdo, Lilian Schmitt, Mariana Vieira, Natália Migon, Paula Dockhorn, Pedro Joel Filho, Rafael Czepielewski e Thiago Gomes, que representam minha segunda família.

Às Profas. Dras. Vera Wolff e Guendalina Oliveira e ao Prof. Dr. Luiz Glock, que guiaram e tutoraram meus primeiros passos em ciência.

A todos que contribuíram de alguma forma, para a minha formação e para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

Resumo	vi
1. Introdução	1
1.1 Delimitação de espécies	1
1.2 Heliconiini	5
1.3 <i>Philaethria</i> Billberg, 1820	6
1.4 <i>Philaethria wernickei</i> e <i>P. pygmalion</i>	8
2. Referências	11
3. Distribuição geográfica da diversidade morfológica e genética em <i>Philaethria wernickei</i> (Lepidoptera: Nymphalidae)	24
3.1 Resumo	25
3.2 Introdução	26
3.3 Material e Métodos	31
3.4 Resultados	43
3.5 Discussão	83
3.6 Referências	90
4. Conclusões	104
Apêndice 1 – Lista de material analisado	105
Apêndice 2 – Lista de coordenadas geográficas do material analisado	116
Anexo – Zoologia: Instruções aos Autores	120

RESUMO

Na taxonomia tradicional e molecular comumente são utilizados poucos indivíduos nas descrições das espécies e as decisões taxonômicas usualmente são feitas sem considerar questões relevantes como diversidade morfológica e genética e polimorfismos intra-específicos. Não utilizar caracteres polimórficos pode resultar em superestimação do número de entidades taxonômicas e, em análises filogenéticas, pode alterar consideravelmente a topologia de árvores. No panorama atual de conhecimento da diversidade biológica e principalmente de critérios operacionais para delimitação de espécies, os procedimentos históricos de descrição e identificação de novas espécies são questionados, sendo necessárias abordagens metodológicas integrativas para tal. Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiinae) é considerado um grupo amplamente estudado e utilizado como organismos modelo para diversas áreas das ciências biológicas, porém a descrição das espécies segue o padrão da taxonomia morfológica e pouca atenção tem sido dispendida na delimitação das espécies. Por exemplo, o gênero mais diverso da tribo, *Heliconius* Kluk, apresenta uma grande variabilidade morfológica no padrão de coloração das asas, sendo nominadas atualmente cerca de 50 espécies e 1500 subespécies e raças geográficas. Por outro lado, o gênero *Philaethria* Billberg apesar de apresentar pouca variação inter-específica, diversas espécies são reconhecidas. Historicamente, caracteres de coloração da face ventral das asas posteriores têm sido utilizados para identificar espécies correspondentes. Neste sentido, objetiva-se avaliar os caracteres que sustentam a separação de *P. pygmalion* (Fruhstorfer 1912) e *P. wernickei* (Röber, 1906), duas espécies com distribuição no Brasil, e realizar inferências sobre a evolução dessas, a partir de uma abordagem integrativa da morfologia clássica, morfometria linear e

geométrica e biologia molecular. A partir dos resultados, propõem-se a sinonímia de *P. wernickei* em *P. pygmalion*, e então estendemos a distribuição desta para a Amazônia, além da Mata Atlântica, pois todas as abordagens metodológicas utilizadas falharam em distingui-las. As características morfológicas comumente utilizadas para tal representaram variações intra-específicas e as árvores de genes indicaram um clado monofilético sem evidências de estruturação interna que suporte a divisão de *P. wernickei* em duas espécies; ou seja, a topologia deste clado é uma politomia, remetendo ao padrão comum de filogenias intra-específicas. Há, por outro lado, indícios de estruturação norte-sul evidenciado pelo DNA mitocondrial, que pode refletir em filopatria ou dispersão a pequenas distâncias das fêmeas, ou ainda a retenção de um haplótipo ancestral mantido por alguma barreira geográfica. Por sua vez, os *loci* de DNA nuclear, não recuperam esta separação geográfica. Embora restritos às espécies de ocorrência no Brasil, os resultados sugerem a necessidade de revisão genérica de *Philaethria*, com base em abordagem metodológica integrativa, a fim de delimitar coesamente as espécies, com base na elaboração de hipóteses filogenéticas a respeito.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Delimitação de espécies

Pode-se considerar que a sistemática têm dois grandes objetivos: 1) descobrir e descrever espécies e 2) determinar suas relações filogenéticas (Wiens 2007). Ainda que as espécies sejam consideradas as unidades fundamentais em ecologia, evolução, sistemática e biologia da conservação (Sites & Marshall 2004; Wiens 2007), há grande discussão em que consistem. Avanços recentes nas discussões destes conceitos levaram a concordância de que espécies são linhagens de metapopulações evolutivamente independentes (de Queiroz 2007).

As descrições de espécies em trabalhos sistemáticos baseados em taxonomia morfológica e molecular têm sido fundamentada em comparações de alguns espécimes (Wiens & Servedio 2000). Porém, estas decisões são geralmente tomadas desconsiderando polimorfismos e plasticidade fenotípica, e raramente são testadas de forma quantitativa.

Recentemente, critérios operacionais utilizando abordagens estatísticas para a delimitação de espécies têm sido propostos (Wiens 2007), como o emprego de diversas regiões do DNA (Althoff *et al.* 2007; Hajibabaei *et al.* 2007), morfologia e morfometria (Mutanen & Pretorius 2007; Villemant *et al.* 2007), modelagem de nichos ecológicos (Raxworthy *et al.* 2007), entre outros. Uma vez que diferentes conjuntos de dados e métodos podem apresentar resultados conflitantes ou ambíguos, faz-se necessária a utilização de abordagens metodológicas integrativas (Sites & Marshall 2004; Ross *et al.* 2010).

Morfologia

Historicamente, a descrição de espécies tem como base a comparação de caracteres morfológicos de alguns poucos indivíduos por espécie; qualquer diferença diagnóstica aparentemente fixa, qualitativa ou quantitativa, é utilizada para sustentar as decisões taxonômicas.

As descrições são feitas comparando-se as estruturas dos organismos a objetos semelhantes. As comparações de tamanho e proporção também são usuais. Essas comparações são extremamente valiosas porque ajudam a focar a atenção em componentes de forma biologicamente significativos. Por outro lado, podem também ser subjetivos e não acurados, especialmente quando as estruturas são complexas e não se assemelham a formas familiares (Zelditch *et al.* 2004). Também, devido ao pequeno número de exemplares empregados, é comum que aspectos como plasticidade fenotípica e polimorfismos não sejam abrangidos, o que pode acarretar na superestimação do número de entidades taxonômicas e, em análises filogenéticas, pode alterar consideravelmente a topologia de árvores (Wiens & Servedio 2000).

Uma das formas de tornar as abordagens morfológicas menos subjetivas dá-se a partir da quantificação de fenômenos biológicos por meio de modelos matemáticos e métodos estatísticos (Zelditch *et al.* 2004). A modificação da forma biológica ao longo da evolução dos grupos envolve ação de fenômenos físicos, sendo passíveis de descrição em termos de leis matemáticas (Monteiro & Reis 1999).

Diferenças na forma entre indivíduos ou suas partes podem significar funções diferentes de estruturas homólogas, respostas diferentes às mesmas pressões seletivas, bem como diferenças no crescimento e morfogênese (Zelditch *et al.* 2004). O estudo analítico da forma encontra-se em crescente expansão, sobretudo devido aos avanços

técnicos da morfometria geométrica (Bookstein 1991, 1996; Monteiro & Reis 1999; Roth & Mercer 2000).

A morfometria tem sido amplamente utilizada em estudos referentes à detecção de processos heterocrônicos (ex., Klingenberg & Spence 1993; Vinicius & Lahr 2003), caracterização de dimorfismo sexual (ex., Adams & Funk 1997), compreensão da trajetória ontogenética de dada estrutura (ex., Rodrigues *et al.* 2005; Rodrigues & Moreira 2005) e delimitação de espécies (ex., Mutanen 2005; Mutanen & Pretorius 2007; Fernandes *et al.* 2009), dentre outras aplicações.

As abordagens morfométricas, lineares e geométricas, podem ser empregadas como métodos de delimitação de espécies, pois permitem identificar táxons crípticos de maneira mais acurada do que o método tradicional de identificação visual (Mutanen & Pretorius 2007). Por exemplo, asas de Insecta têm sido utilizadas com sucesso na discriminação e delimitação de espécies crípticas (ex., Imasheva *et al.* 2000; Houle *et al.* 2003; Villemant *et al.* 2007; Ludoski *et al.* 2008).

Marcadores moleculares

Pelos avanços em seqüenciamento e capacidade computacional de processamento de dados, as seqüências de DNA tornaram-se uma das maiores fontes de informação para o entendimento de processos evolutivos e genética de populações (Hajibabaei *et al.* 2007). Atualmente, marcadores moleculares são amplamente empregados em áreas como estruturação de populações, especiação, hibridação, introgressão, filogenia, sistemática e taxonomia, entre outros (Avice 2004).

A utilização dos marcadores moleculares em taxonomia, sistemática e delimitação de espécies aumentou com a proposta da criação de bancos de dados de

seqüências representantes de todos os organismos vivos (Vogler & Monaghan 2007), o intitulado “código de barras de DNA” (*DNA barcode*; Hebert *et al.* 2003a, b; Tautz *et al.* 2003). Este se fundamenta na premissa de que uma pequena seqüência padronizada pode distinguir espécies, uma vez que a variação genética entre ultrapasse a existente dentro as espécies (Hebert *et al.* 2003a).

A aplicação em larga-escala dos dados moleculares revolucionou a taxonomia, mas a validade e os aspectos práticos desta abordagem molecular tem sido objeto de diversas críticas relativas a aspectos da herdabilidade dos genes mitocondriais e suas taxas evolutivas e a falta de integração com outros marcadores nucleares e caracteres morfológicos (Lipscomb *et al.* 2003; Moritz & Cicero 2004; Will & Rubinoff 2004; Wheeler 2005; Brower 2006; Crisci 2006; Elias *et al.* 2007; Dasmahapatra *et al.* 2010). Com a atual compreensão das diferenças entre árvores de genes e árvores de espécies (Brower *et al.* 1996; Nichols 2001) há a demanda de se utilizar diversos tipos de marcadores moleculares e em grande escala para gerar hipóteses sobre a delimitação de espécies e relações filogenéticas.

Atualmente, as informações obtidas com seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido contrastadas com diversos genes nucleares (ex., Wahlberg *et al.* 2010) e marcadores de co-dominância, como microssatélites e AFLP (ex., Orsini *et al.* 2004; Pellmyr *et al.* 2007; Rout *et al.* 2008; Dasmahapatra *et al.* 2009; Mendelson & Wong 2010); além da integração com dados morfológicos, dentre outros, como por exemplo, aqueles de cunho comportamental e ecológico (ex., Su *et al.* 2008; Winterton & Makarkin 2010; Ross *et al.* 2010).

1.2 Heliconiini

A tribo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae), popularmente conhecidos como o grupo das borboletas-do-maracujá, constitui-se um dos mais estudados grupos de borboletas. Devido à coloração aposemática dos adultos, participação em anéis miméticos e variabilidade geográfica, a tribo têm sido objeto de estudos taxonômicos há mais de um século (Stichel 1906; Michener 1942; Emsley 1963; Brown & Mielke 1972; Turner 1976; Brown 1981; Brower 1994; Brower & Egan 1997; Penz 1999). Também têm servido como modelos para o entendimento da coevolução entre insetos e plantas (ex., Ehrlich & Raven 1965; Gilbert 1975; Benson *et al.* 1976; Brower 1997; Rodrigues & Moreira 1999, 2002, 2004; Bianchi & Moreira 2005; Kerpel *et al.* 2006; Jorge *et al.* 2011), genética (ex., Turner 1971; Sheppard *et al.* 1985), biologia de populações (ex., Gilbert & Smiley 1978; Benson 1978; Mallet 1986) e da conservação (ex., Brown 1981; Gilbert 1991; Brown & Freitas 2000), especiação e hibridação (ex., Naisbit *et al.* 2002; Mavárez *et al.* 2006; Mallet *et al.* 2007; Mallet 2008, 2009; Kronforst *et al.* 2009; Brower 2010)

Heliconiini distribui-se por toda a região Neotropical e, atualmente, possui 72 espécies (Lamas 2004), distribuídas em 10 gêneros, que são: *Agraulis* Boisduval & Le Conte, *Dione* Hübner, *Dryadula* Michener, *Dryas* Hübner, *Eueides* Hübner, *Heliconius* Kluk, *Laparus* Billberg, *Neruda* Turner, *Philaethria* Billberg e *Podotricha* Michener.

Heliconius e *Eueides* detêm a maior diversidade do gênero, apresentando aproximadamente 50 espécies e 1500 raças geográficas (Lamas 2004). *Heliconius* possui grande diversidade fenotípica e diversas hipóteses já foram propostas para explicar esta diversidade (McMillan *et al.* 1997; Naisbit *et al.* 2003). Em contraponto, os demais gêneros possuem pequena variabilidade inter-específica, mas diversas espécies são reconhecidas.

Diversas espécies de *Heliconius* têm sido utilizados como modelos de estudo em ecologia comportamental e evolução (ex., Gilbert 1991), em parte devido a sua fácil adaptação às condições de insetário e laboratório (criação de imaturos), bem como ao fácil cultivo de suas plantas hospedeiras - os maracujás (Passifloraceae). No contexto da interação inseto-planta, têm fornecido um amplo aporte de conhecimento a respeito da coevolução entre insetos e plantas hospedeiras (Gilbert 1975, 1991; Benson *et al.* 1976; Brower 1997; Futuyma 2000; Kerpel *et al.* 2006). As espécies dos outros gêneros têm sido, em sua maioria, pouco utilizadas neste contexto, em parte devido às dificuldades de criação dos adultos e à falta de conhecimento de caracteres biológicos e ecológicos.

1.3 *Philaethria* Billberg, 1820

Brown (1981) aponta a necessidade de revisão de *Philaethria*, pois *P. dido* poderia representar um complexo de espécies crípticas. Posteriormente, Suomalainen & Brown (1984) e Brown *et al.* (1992), estudando o número cromossômico de *Philaethria*, encontram pelo menos oito conjuntos cromossômicos haplóides em *P. dido*, o que indicaria a existência de pelo menos mais sete espécies. Em contrapartida, *P. pygmalion* (Fruhstorfer, 1912) e *P. wernickei* (Röber, 1906), consideradas válidas pela mais recente revisão a respeito (Constantino & Salazar 2010) e objetos do presente estudo, apresentam número constante ($n = 29$).

Assim, diversas espécies e subespécies foram descritas nas últimas duas décadas tendo o número cromossômico como principal norteador nos estudos taxonômicos de *Philaethria*, e o padrão de coloração ventral das asas posteriores e alguns caracteres morfológicos da genitália masculina são utilizados para sustentá-los. Nesse contexto, o gênero é composto atualmente por dez espécies (Constantino & Salazar 2010): *Philaethria dido* (Linnaeus, 1763), *P. ostara* (Röber, 1906), *P. wernickei* (Röber, 1906),

P. diatonica (Fruhstorfer, 1912), *P. pygmalion* (Fruhstorfer, 1912), *P. constantinoi* Salazar, 1991; *P. andrei* Brévignon, 2002; *P. neildi* Constantino & Salazar 2010; *P. browni* Constantino & Salazar 2010, e *P. romeroi* Constantino & Salazar 2010.

Apesar de diversas hipóteses de relacionamentos e filogenias em Heliconiini terem sido propostas (Michener 1942; Emsley 1963; Brown 1981; Brower 1994, 1997, 2000; Brower & Egan 1997; Penz 1999; Penz & Peggie 2003; Beltrán *et al.* 2007), não há consenso quanto à posição filogenética do gênero *Philaethria*, sendo senso comum, porém, o reconhecimento da posição basal deste em Heliconiini.

Em menor grau de compreensão encontram-se as relações entre as espécies do gênero, sendo que somente três estudos utilizaram mais de uma, obtendo conclusões diferentes. Brown (1981), tendo como base caracteres morfológicos do adulto e nas relações propostas por Emsley (1963), concluiu que *P. dido* é grupo irmão de *P. wernickei* e *P. pygmalion*. Penz (1999), por sua vez, ao utilizar caracteres morfológicos dos estágios imaturos e dos adultos das mesmas espécies, não conseguiu estabelecer suas relações, concluindo somente que *Philaethria* é monofilético. Beltrán *et al.* (2007), utilizando apenas *P. dido* e *P. diatonica*, reconheceu a existência de monofilia no gênero, bem como a posição basal do mesmo em Heliconiini. Os demais trabalhos de cunho filogenético se propõem a resolver as relações genéricas em Heliconiini e utilizam, em sua maioria, somente *P. dido*.

A pequena representatividade de espécies de *Philaethria* em estudos filogenéticos pode ser resultado da dificuldade de coleta e da falta de conhecimento de caracteres biológicos, ecológicos e distribuição das espécies. *P. dido* possui a distribuição mais abrangente conhecida, ocorrendo do sul do México ao sudeste do Brasil (Suomalainen & Brown 1984; Constantino & Salazar 2010); *P. ostara*, *P. pygmalion*, *P. andrei* e *P. constantinoi* têm distribuição restrita à região amazônica e ao

norte da Cordilheira dos Andes (Salazar 1991; Constantino 1999; Brévignon 2002; Constantino & Salazar 2010); *P. diatonica*, na América Central (Constantino & Salazar 2010), e *P. wernickei*, nas regiões sul, sudeste e por outros autores, no centro-oeste e nordeste do Brasil (Suomalainen & Brown 1984; Constantino 1999). A distribuição conhecida das demais espécies é restrita às localidades tipo.

A maior parte do conhecimento morfológico e biológico sobre o gênero corresponde a *P. dido*, sendo os estudos mais intensivos com as populações de Trinidad e Tobago (Beebe *et al.* 1960; Fleming 1960) e Costa Rica (Young 1974). Destacam-se ainda os trabalhos de Brown & Mielke (1972) e Brown (1981) que exploraram também caracteres morfológicos de diferenciação interespecífica.

As informações acerca de *P. andrei*, *P. browni*, *P. constantinoi*, *P. diatonica*, *P. neildi*, *P. ostara* e *P. romeroi* restringem-se aos respectivos trabalhos de descrição (Salazar 1991; Constantino 1999; Brévignon 2002; Constantino & Salazar 2010). *P. pygmalion* e *P. wernickei* já foram abordadas em diversos estudos (ex., Brown & Mielke 1972; Brown & Benson 1977; Brown 1981; Penz 1999; Dell'Erba *et al.* 2005; Barão & Moreira 2010).

De forma geral, todos os trabalhos envolvendo o gênero utilizam poucos espécimes, não considerando as variações geográficas.

1.4 *Philaethria wernickei* e *P. pygmalion*

P. wernickei e *P. pygmalion* já foram consideradas a mesma entidade biológica, ou reconhecidas como duas subespécies representantes de variantes geográficas (Brown & Mielke 1972). Após Brown & Benson (1977), *P. pygmalion* recebe o status de espécie, justificado por diferenças na coloração das larvas. Constantino & Salazar

(2010) apresentam diversas características nas asas e genitália masculina que sustentam a separação destas, destacando-se os tamanhos relativos das bandas pós-discal interna e pós-discal mediana na face ventral das asas posteriores. Segundo Constantino & Salazar (2010), *P. wernickei* apresenta relação entre tais bandas de 1:1, e *P. pygmalion*, de 1:0,5 (ou menor). Estas espécies, segundo Constantino & Salazar (2010), apresentariam distribuição alopatrica, estando separadas pela diagonal árida da América do Sul (Morrone 2006).

Estudos envolvendo *P. wernickei* são mais abundantes do que as outras espécies, excetuando-se *P. dido*. Dell'Erba *et al.* (2005) caracterizaram a morfologia ultraestrutural externa do estágio de ovo e identificaram caracteres que a diferencia das demais espécies de heliconíneos ocorrentes no Rio Grande do Sul (RS). Barão & Moreira (2010) descrevem a ultraestrutura tegumentar externa dos estágios de larva e pupa, e indicam grande variação na coloração das larvas. Os adultos têm hábito solitário e voam a considerável altura. A oviposição ocorre preponderantemente sobre passifloráceas de grande massa foliar (Benson *et al.* 1975; Brown 1981; Dell'Erba *et al.* 2005), comumente nas faces abaxial ou adaxial das folhas velhas e gavinhas secas ou verdes (Dell'Erba *et al.* 2005).

Informações acerca de *P. pygmalion* se restringem às descrições dos estágios imaturos, em especial da larva de quinto instar, que apresenta grande variação na coloração (Brown & Benson 1977; Brown 1981) e da genitália masculina (Constantino & Salazar 2010). Além disso, são conhecidas algumas espécies de plantas hospedeiras (Brown & Fernandez 1975; Benson *et al.* 1976; Beccaloni *et al.* 2008).

Como *P. wernickei* e *P. pygmalion* foram diversas vezes consideradas a mesma entidade biológica, e os resultados das filogenias e observações preliminares indicam incongruências com as informações disponíveis, há a necessidade de avaliações

quantitativas a respeito, sob maior abrangência amostral, de forma que ao menos parte da variabilidade fenotípica existente seja levada em consideração, o que é feito no presente estudo. Objetiva-se avaliar os caracteres que sustentam a separação de *P. pygmalion* e *P. wernickei* e realizar inferências sobre a evolução dessas espécies, a partir de uma abordagem integrativa da morfologia, morfometria linear e geométrica e biologia molecular.

2. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.C. & D.J. FUNK. 1997. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. **Systematic Biology** **46**: 180-194.
- ALTHOFF, D.M.; M.A. GITZENDANNER & K.A. SEGRAVES. 2007. The utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. **Systematic Biology** **56**: 477-484.
- AVISE, J.C. 2004. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York, Chapman & Hall.
- BARÃO, K.R. & G.R.P. MOREIRA. 2010. External morphology of the immature stages of Neotropical heliconians: VIII. *Philaethria wernickei* (Röber) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Entomologia** **54**: 406-418.
- BECCALONI, G.W.; A.L. VILORIA; S.K. HALL & G.S. ROBINSON. 2008. **A catalog of the hostplants of the Neotropical butterflies**. Zaragoza, The Natural History Museum, Monografias Tercer Milenio. 536p.
- BEEBE, W.; J. CRANE & H. FLEMING. 1960. A comparison of eggs, larvae and pupae in fourteen species of Heliconiine butterflies from Trinidad, W. I. **Zoologica** **45**: 111-154.
- BELTRÁN, M.; C.D. JIGGINS; A.V.Z. BROWER; E. BERMINGHAM & J. MALLETT. 2007. Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. **Biological Journal of the Linnean Society** **92**: 221-239.

- BENSON, W.W. 1978. Resource partitioning in passion-vine butterflies. **Evolution** **32**: 493-518.
- BENSON, W.W.; K.S. BROWN JR. & L.E. GILBERT. 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution** **29**: 659-680.
- BIANCHI, V. & G.R.P. MOREIRA. 2005. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **22**: 43-50.
- BOOKSTEIN, F.L. 1991. **Morphometrics tools for landmark data: geometry and biology**. New York, Cambridge University Press. 435p.
- BOOKSTEIN, F.L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bulletin of Mathematical Biology** **58**: 313-365.
- BRÉVIGNON, C. 2002. Description d'un nouveau *Philaethria* provenant de Guyane Française et notes sur sa biologie. **Lambillionea** **102**: 469- 473.
- BROWER A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **91**: 6491-6495.
- BROWER, A.V.Z. 1997. The evolution of ecologically important characters in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a cladistic review. **Zoological Journal of the Linnean Society** **119**: 457-472.
- BROWER, A.V.Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae). **Systematics and Biodiversity** **4**: 127-132.

- BROWER, A.V.Z. 2010. Hybrid speciation in *Heliconius* butterflies? A review and critique of the evidence. **Genetica**. doi: 10.1007/s10709-010-9530-4.
- BROWER, A.V.Z.; R. DESALLE & A.P. VOGLER. 1996. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics** **27**: 423-450.
- BROWER, A.V.Z. & M.G. EGAN. 1997. Cladistic analysis of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiiti): a revised phylogenetic position for *Eueides* based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. **Proceedings of the Royal Society B** **264**: 969-977. doi: 10.1098/rspb.1997.0134.
- BROWN, K.S.Jr. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology** **26**: 427-456.
- BROWN, K.S.JR. & O.H.H. MIELKE. 1972. The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. **Zoologica** **57**: 1-40.
- BROWN, K.S.JR. & W.W. BENSON. 1977. Evolution in modern amazonian non-forest islands: *Heliconius hermathena*. **Biotropica** **9**: 95-117.
- BROWN, K.S.JR. & F. FERNANDEZ-YEPEZ. 1985 Los Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) de Venezuela. **Boletin de Entomologia Venezolana** **3**: 29-76.
- BROWN, K.S.JR.; T.C. EMMEL; P.J. ELIAZAR & E. SUOMALAINEN. 1992. Evolutionary patterns in chromosome numbers in neotropical Lepidoptera. **Hereditas** **117**: 109-125.
- BROWN, K.S.JR. & A.V.L. FREITAS. 2000. Atlantic Forest butterflies: indicators for landscape conservation. **Biotropica** **32**: 934-956.

- CONSTANTINO, L.M. 1999. Nuevas especies, subespecies y un nuevo genero de Ropaloceros del occidente de Colombia. **Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural 3**: 57-68.
- CONSTANTINO, L.M. & J.A. SALAZAR. 2010. A review of *Philaethria dido* species complex (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) and description of three new sibling species from Colombia and Venezuela. **Zootaxa 2720**: 1-27.
- CRISCI, J.V. 2006. One-dimensional systematist: perils in a time of steady progress. **Systematic Botany 31**: 217-221.
- DASMAHAPATRA, K.K.; J.I. HOFFMAN & W. AMOS. 2009. Pinniped phylogenetic relationships inferred using AFLP markers. **Heredity 103**: 168-77.
- DASMAHAPATRA, K.K.; M. ELIAS; R.I. HILL; J.I. HOFFMAN & J. MALLET. 2010. Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. **Molecular Ecology Resources 10**: 264-273.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology 56**: 879-886.
- DELL'ERBA, R.; L.A. KAMINSKI & G.R.P. MOREIRA. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Zoologia 95**: 29-46.
- EHRlich, P.R. & P.R. RAVEN. 1965. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution 18**: 586-618.
- ELIAS, M.; R.I. HILL; K.R. WILLMOTT; K.K. DASMAHAPATRA; A.V.Z. BROWER & J. MALLET. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proceedings of the Royal Society B 274**: 2881-2889.

- EMSLEY, M. 1963. A morphological study of imago Heliconiinae (Lep.: Nymphalidae) with a consideration of the evolutionary relationships within the group. **Zoologica** **48**: 85-129.
- FERNANDES, F.A.; R. FORNEL; P. CORDEIRO-ESTRELA & T.R.O. FREITAS. 2009. Intra- and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. **Zoological Journal of the Linnean Society** **155**: 220-237.
- FLEMING, H. 1960. The first instar larvae of the Heliconiinae (Butterflies) of Trinidad, W.I. **Zoologica** **45**: 91-110.
- FUTUYMA, D.J. 2000. Some current approaches to the evolution of plant-herbivore interactions. **Plant Species Biology** **15**: 1-9.
- GILBERT, L.E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: GILBERT, L.E. & P.R. RAVEN (Eds.). **Coevolution of Animals and Plants**. Austin, University of Texas Press. 210-240p.
- GILBERT, L.E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: PRICE, P.W. (Ed.). **Plant-animal interactions**. Chichester, Wiley. 403-427p.
- GILBERT, L.E & J.T. SMILEY. 1978. Determinants of local diversity in phytophagous insects: host specialists in tropical environments. In: MOUND, L.A. & N. WALOFF (Eds.). **Diversity of insect faunas**. London, Blackwell. 89-104p.
- HAJIBABAEI, M.; G.A.C. SINGER; P.D.N. HEBERT & D.A. HICKEY. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics** **23**: 167-172.

- HEBERT, P.D.N.; A. CYWINSKA; S.L. BALL & J.R. DEWAARD. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B 270**: 313-321.
- HEBERT, P.D.N.; S. RATNASINGHAM & J.R. DEWAARD. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B 270**: S96-99.
- HOULE, D.; J. MEZEY; P. GALPERN & A. CARTER. 2003. Automated measurement of *Drosophila* wings. **BMC Evolutionary Biology 3**: 25-37
- IMASHEVA, A.G.; B. MORETEAU & J.R. DAVID. 2000. Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. **Genetical Research 76**: 237-247.
- KERPEL, S.M.; E. SOPRANO & G.R.P. MOREIRA. 2006. Effect of nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and consequences for larval performance and oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). **Neotropical Entomology 35**: 192-200.
- KLINGENBERG, C.P. & J.R. SPENCE. 1993. Heterochrony and allometry: lessons from the water strider genus *Limnopus*. **Evolution 47**: 1834-1853.
- KRONFORST, M.R.; C.A. SALAZAR; M. LINARES & L.E. GILBERT. 2009. No genomic mosaicism in a putative hybrid butterfly species. **Proceedings of the Royal Society of London 274**: 1255-1264.
- JORGE, L.R.; P. CORDEIRO-ESTRELA; L.B. KLACZKO; G.R.P. MOREIRA & A.V.L. FREITAS. 2011. Host-plant dependent wing phenotypic variation in *Heliconius erato*. **Biological Journal of the Linnean Society**.

- LAMAS, G. 2004. Checklist: Part 4A. Hesperioidea - Papilionoidea. In: J. B. Heppner (Ed.). **Atlas of Neotropical Lepidoptera**. Volume 5A. Gainesville, Association for Tropical Lepidoptera, Scientific Publishers. xxxiv+428p.
- LIPSCOMB, D.; N. PLATNICK & Q.D. WHEELER. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution** **18**: 65-68.
- LUDOSKI, J.; L. FRANCUSKI; A. VUJIC & V. MILANKOV. 2008. The *Cheilosia canicularis* group (Diptera: Syrphidae): species delimitation and evolutionary relationships based on wing geometric morphometrics. **Zootaxa** **1825**: 40-50.
- MALLET, J. 1986. Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behavior: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Oecologia** **68**: 210-217.
- MALLET, J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** **63**: 2971-2986.
- MALLET, J. 2009. Rapid speciation, hybridization and adaptive radiation in the *Heliconius melpomene* group. In: BUTLIN, R.K.; J.R. BRIDLE & D. SCHLUTER (Eds.). **Speciation and patterns of diversity**. Cambridge, Cambridge University Press. 177-194p.
- MALLET, J.; M. BELTRÁN; W. NEUKIRCHEN & M. LINARES. 2007. Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. **BMC Evolutionary Biology** **7**: 28.
- MAVÁREZ, J.; C.A. SALAZAR; E. BERMINGHAM; C. SALCEDO; C.D. JIGGINS; M. LINARES. 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. **Nature** **441**: 868-71.

- MCMILLAN, W.O.; C.D. JIGGINS & J. MALLETT. 1997. What initiates speciation in passion-vine butterflies? **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** **94**: 8628-8633.
- MENDELSON, T.C. & M.K. WONG. 2010. AFLP phylogeny of the snubnose darters and allies (Percidae: Etheostoma) provides resolution across multiple levels of divergence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **57**: 1253-1259.
- MICHENER, C.D. 1942. A generic revision of the Heliconiinae (Lepidoptera, Nymphalidae). **American Museum Novitates** **1197**: 1-8.
- MONTEIRO, L. R. & S. F. REIS. 1999. **Princípios de morfometria geométrica**. São Paulo, Holos. 198p.
- MORITZ, C & C. CICERO. 2004. DNABarcoding: promise and pitfalls. **PLoS Biology** **2**: 1529-1531.
- MORRONE, J.J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. **Annual Review of Entomology** **51**: 467-494.
- MUTANEN, M. 2005. Delimitation difficulties in species splits: a morphometric case study on the *Euxoa tritici* complex (Lepidoptera, Noctuidae). **Systematic Entomology** **30**: 632-643.
- MUTANEN, M. & E. PRETORIUS. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. **Systematic Entomology** **32**: 371-386.
- NAISBIT, R.E.; C.D. JIGGINS; M. LINARES; C.A. SALAZAR & J. MALLETT. 2002. Hybrid Sterility, Haldane's Rule and Speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. **Genetics** **161**: 1517-1526.

- NAISBIT, R.E.; C.D. JIGGINS & J. MALLET. 2003. Mimicry: developmental genes that contribute to speciation. **Evolution & Development** **5**: 269-280.
- NICHOLS, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. **Trends in Ecology & Evolution** **16**: 358-364.
- ORSINI, L.; S. HUTTUNEN & C. SCHLÖTTERER. 2004. A multilocus microsatellite phylogeny of the *Drosophila virilis* group. **Heredity** **93**: 161-165
- PELLMYR, O.; K.A. SEGRAVES; D.M. ALTHOFF; M. BALCÁZAR-LARA & J. LEEBENS-MACK. 2007. The phylogeny of yuccas. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **43**: 493-501.
- PENZ, C.M. 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. **Zoological Journal of the Linnean Society** **127**: 277-344.
- PENZ, C.M. & D. PEGGIE. 2003. Phylogenetic relationships among Heliconiinae genera based on morphology (Lepidoptera: Nymphalidae). **Systematic Entomology** **28**: 451-479.
- RAXWORTHY, C.J.; C.M. INGRAM; N. RABIBISOA & R.G. PEARSON. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. **Systematic Biology** **56**: 907-923.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 1999. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. **Journal of the Lepidopterists' Society** **53**: 108-113.

- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. **Brazilian Journal of Biology** **62**: 321-332.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2004. Seasonal variation in larval host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. **Austral Ecology** **29**: 437-445.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2005. Comparative description of the immature stages of two very similar leaf footed bugs, *Holymeria clavigera* (Herbst) and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas) (Hemiptera, Coreidae, Anisoscelini). **Revista Brasileira de Entomologia** **49**: 7-14.
- RODRIGUES, D.; D. SANFELICE; L.R. MONTEIRO & G.R.P. MOREIRA 2005. Ontogenetic trajectories and hind tibia geometric morphometrics of *Holymeria clavigera* (Herbst) and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas) (Hemiptera: Coreidae). **Neotropical Entomology** **34**: 769-776.
- ROSS, K.G.; D. GOTZEK; M.S. ASCUNCE & D.D. SHOEMAKER. 2010. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology** **59**: 162-184.
- ROTH, V.L. & J.M. MERCER. 2000. Morphometrics in development and evolution. **American Zoology** **40**: 801-810.
- ROUT, P.K.; M.B. JOSHI; A. MANDAL; D. LALOE; L. SINGH & K. THANGARAJ. 2008. Microsatellite-based phylogeny of Indian domestic goats. **BMC Genetics** **9**: 11.
- SALAZAR, J.A. 1991. Descripción de una nueva especie de *Philaethria* Billberg, 1820 para el occidente de Colombia (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). **SHILAP Revista de Lepidopterologia** **19**: 273-279.

- SHEPPARD, P.M.; J.R.G. TURNER; K.S. BROWN JR.; W.W. BENSON & M.C. SINGER. 1985. Genetics and the evolution of muellerian mimicry in *Heliconius* butterflies. **Philosophical Transactions of the Royal Society B 308**: 433-613.
- SITES, J.W.JR. & J.C. MARSHALL. 2004. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 35**: 199-227.
- SU, K.F.; S.N. KUTTY & R. MEIER. 2008. Morphology versus molecules: the phylogenetic relationships of Sepsidae (Diptera: Cyclorrhapha) based on morphology and DNA sequence data from ten genes. **Cladistics 24**: 902-916.
- SUOMALAINEN, E. & K.S. BROWN JR. 1984. Chromosome number variation within *Philaethria* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiini). **Chromossoma 90**: 170-176.
- TAUTZ, D.; P. ARCTANDER; A. MINELLI; R.H. THOMAS & A.P. VOGLER. 2003. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution 18**: 70-74.
- TURNER, J.R.G. 1971. Two thousand generations of hybridization in a *Heliconius* butterfly. **Evolution 25**: 471-482.
- TURNER, J.R.G. 1976. Adaptive radiation and convergence in subdivisions of the butterfly genus *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Zoological Journal of the Linnean Society 58**: 297-308.
- VILLEMANT, C.; G. SIMBOLOTTI & M. KENIS. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Systematic Entomology 32**: 625-634.
- VINICIUS, L. & M.M. LAHR. 2003. Morphometric heterochrony and the evolution of growth. **Evolution 57**: 2459-2468.

- VOGLER, A. P. & M.T. MONAGHAN. 2007. Recent advances in DNA taxonomy. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** **45**: 1-10.
- WAHLBERG, N.; J. LENEVEU; U. KODANDARAMAIAH; C. PEÑA; S. NYLIN; A.V.L. FREITAS & A.V.Z. BROWER. 2009. Nymphalid butterflies diversify following near demise at the Cretaceous/Tertiary boundary. **Proceedings of the Royal Society B** **276**: 4295-302.
- WHEELER, Q.D. 2005. Losing the plot: DNA “barcodes” and taxonomy. **Cladistics** **21**: 405-407.
- WIENS, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology** **56**: 875-878.
- WIENS, J.J. & M.R. SERVEDIO. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society B** **267**: 631-636.
- WILL, K.W. & D. RUBINOFF. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics** **20**: 47-55.
- WINTERTON, S. L. & V.N. MAKARKIN. 2010. Phylogeny of moth lacewings and giant lacewings (Neuroptera: Ithonidae, Polystoechotidae) using DNA sequence data, morphology, and fossils. **Annals of the Entomological Society of America** **103**: 511-522.
- YOUNG, A.M. 1974. Further observations on the natural history of *Philaethria dido dido* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). **Journal of the New York Entomological Society** **82**: 30-41.

ZELDITCH, M.L.; D.L. SWIDERSKI; H.D. SHEETS & W.L. FINK. 2004. **Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer**. New York, Elsevier. 443p.

3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM *Philaethria wernickei* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

Kim R. Barão¹, Gislene L. Gonçalves², Marcus R. Kronforst³, Olaf H. H. Mielke⁴ & Gilson R. P. Moreira^{1,5}

¹ PPG Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43435, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

² PPG Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Northwest Labs, FAS Center for Systems Biology, Harvard University. 52 Oxford St., Northwest Lab Room 454.40-2, 02138-190, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos.

⁴ Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brasil.

⁵ Autor correspondente. Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43435, Agronomia, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.

3.1 RESUMO

Na taxonomia tradicional e molecular comumente são utilizados poucos espécimes nas descrições das espécies e as decisões taxonômicas usualmente não consideram questões relevantes, como diversidade morfológica e genética e polimorfismos intra-específicos. Mesmo se reconhecendo em *Heliconiini* grande variabilidade fenotípica intra-específica e *Philaethria* Billberg constituindo um complexo de espécies crípticas, este tem sido o procedimento adotado nas descrições das espécies correspondentes. Neste sentido, objetiva-se avaliar os caracteres que sustentam a separação de *P. pygmalion* (Fruhstorfer, 1912) e *P. wernickei* (Röber, 1906) e realizar inferências sobre a evolução dessas espécies, a partir de uma abordagem integrativa da morfologia clássica, morfometria linear e geométrica e biologia molecular. Propõem-se a sinonímia de *P. wernickei* com *P. pygmalion* **syn nov.**, pois não foram encontradas diferenças entre as genitálias masculinas e na forma das asas, além de haver sobreposição entre os caracteres comumente utilizados para identificá-las. Ainda, as análises filogenéticas recuperaram um clado monofilético para *P. pygmalion* e *P. wernickei*, sem estruturação interna suportada. Do ponto de vista populacional, os haplótipos de DNA mitocondrial indicaram um clado estruturado na região norte e outro na região sul do Brasil; porém, os *loci* de DNA nuclear, não reconstituíram esta separação geográfica. A estruturação de haplótipos nas regiões norte-sul pode indicar que as fêmeas de *P. wernickei* apresentam filopatria, ou dispersam em menores distâncias que os machos, ou a retenção de um polimorfismo ancestral suportado por alguma barreira geográfica.

Palavras chave: delimitação de espécies, filogenia intra-específica, morfometria geométrica, morfometria linear, variação intra-específica.

3.2 INTRODUÇÃO

A delimitação de espécies é influenciada pelo conceito que se aplica a espécie e pelo critério operacional utilizado para se hipotetizar a existência de novos táxons. Porém, diversos autores têm argumentado que os conceitos de espécie e os critérios operacionais de delimitação destas devem ser tratados epistemologicamente de forma independente; o primeiro, como as propriedades necessárias e suficientes para definir a categoria de espécie e, o segundo, como os tipos de evidências necessárias para atribuir entidades particulares a esta categoria (Hey 2006; de Queiroz 2007; Ross *et al.* 2010). Avanços no conceito de espécie, como linhagens de metapopulações evolutivamente independentes (de Queiroz 2007), permitiram esta dissociação. A delimitação de espécies corresponde à identificação e síntese dos elementos relevantes para as identificações.

O procedimento comum em trabalhos sistemáticos baseados em taxonomia morfológica e/ou molecular têm sido comparar os caracteres entre alguns espécimes e determinar quais as diferenças diagnósticas sustentam sua separação (Wiens & Servedio 2000). De forma geral, nestes enfoques, as espécies são delimitadas com base em pelo menos um caractere quantitativo e/ou qualitativo que não se sobrepõem com outra espécie (Wiens 2007). Historicamente, este é o procedimento adotado pela taxonomia tradicional e aparentemente retorna algum resultado biológico, já que se duas espécies são consistentemente distinguidas uma da outra por diferenças morfológicas estão presumivelmente isoladas por fluxo gênico (Wiens 2007). Porém, estas decisões são geralmente tomadas considerando-se um pequeno número amostral, e raramente são testadas de forma quantitativa.

A abordagem de tais trabalhos desconsidera questões como diversidade morfológica e genética e polimorfismos intra-específicos, mesmo que a presença de

polimorfismos em uma única espécie seja um fenômeno biológico amplamente documentado e uma das condições necessárias à existência de seleção natural (Rae 2002). Não incluir caracteres polimórficos e descrever esta variação como novas entidades biológicas, pode resultar em superestimação do número de entidades taxonômicas e, em análises filogenéticas, pode alterar consideravelmente a topologia de árvores (Wiens & Servedio 2000).

No panorama atual de conhecimento da diversidade biológica e principalmente de critérios operacionais para delimitação de espécies (ex., Knowles & Carstens 2007; Shaffer & Thomson 2007; Raxworthy *et al.* 2007; Yahng & Rannala 2010), os procedimentos históricos de descrição e identificação de novas espécies são questionados. Há um consenso da necessidade de abordagens integrativas de múltiplos métodos para a delimitação destas, como modelagem de nichos ecológicos (Raxworthy *et al.* 2007), diferentes regiões do DNA (Althoff *et al.* 2007; Dasmahapatra *et al.* 2010) e morfometria e morfologia (Mutanen & Pretorius 2007; Villemant *et al.* 2007), entre outros (ex, Ross *et al.* 2010).

Mesmo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) sendo um grupo amplamente estudado e considerado como organismos modelo para diversas áreas das ciências biológicas, a descrição das espécies segue o padrão da taxonomia tradicional e pouca atenção tem sido dispendida na delimitação das espécies. Por exemplo, o gênero mais diverso da tribo, *Heliconius*, apresenta uma grande variabilidade morfológica no padrão de coloração das asas, sendo nominadas atualmente cerca de 50 espécies e 1500 subespécies e raças geográficas (Holzinger & Holzinger 1994; Lamas 2004); é este também o gênero mais estudado (ex., Brown 1981; Brower 1994; Krenn & Penz 1998; Kaminski *et al.* 2002; Beltrán *et al.* 2007; Mallet 2009; Quek *et al.* 2010). Em contraponto, os gêneros basais da tribo apresentam pequena diversidade fenotípica, mas

diversas espécies descritas, resultando em complexos de espécies de difícil identificação. *Philaethria* Billberg, 1820 enquadra-se neste panorama, pois todas as espécies correspondentes caracterizam-se pelo padrão de coloração preto com manchas verdes da face dorsal das asas, com pouca variação no padrão destas. Historicamente, caracteres de coloração da face ventral das asas posteriores tem sido utilizados para identificar as espécies correspondentes.

Brown (1981) destacou que *P. dido* (Linnaeus, 1763) possivelmente representa um complexo de espécies crípticas. Posteriormente, Suomalainen & Brown (1984) encontraram grande variabilidade no número cromossômico de *P. dido* ao longo de sua distribuição geográfica e sugeriram a existência de três a cinco novas espécies, sem descrevê-las. Os esforços taxonômicos subsequentes realizados no gênero foram guiados por esses dados. Assim, segundo Lamas (2004), *Philaethria* seria composto por sete espécies. Recentemente, Constantino & Salazar (2010), com base na revisão de caracteres morfológicos e número cromossômico haplóide, descreveram três espécies novas e sete subespécies, todas com pequena variação fenotípica inter-específica. Somente Constantino & Salazar (2010) estudaram os adultos de todas as espécies do gênero, com relação aos adultos. Até então, a maior parte dos trabalhos focavam *P. dido*, como, por exemplo, em relação à morfologia dos estágios imaturos (Beebe *et al.* 1960; Fleming 1960), morfologia geral do adulto e genitália (Emsley 1963; Brown & Mielke 1972), história de vida (Young 1974), biologia (Brown 1981) e número cromossômico haplóide (Suomalainen & Brown 1984; Brown *et al.* 1992).

As informações disponíveis para as demais espécies de *Philaethria* estão restritas às descrições originais (ex., Salazar 1991; Constantino 1999; Brévignon 2002; Constantino & Salazar 2010), a exceção de *P. pygmalion* (Fruhstorfer, 1912) e *P. wernickei* (Röber, 1906). Para estas últimas, os dados existentes são esparsos, estando

presentes em trabalhos de sistemática sobre a tribo (Brown 1981; Penz 1999). A morfologia externa dos estágios imaturos de *P. wernickei* já foram descritos (Dell'Erba *et al.* 2005; Barão & Moreira 2010), existindo também apontamentos extensivos sobre biologia destes (Brown & Mielke 1972; Brown 1981; Dell'Erba *et al.* 2005).

P. wernickei e *P. pygmalion* já foram consideradas como entidades biológicas distintas, ou reconhecidas como duas subespécies da mesma espécie, representantes de variantes geográficas (ex., Brown & Mielke 1972). *P. wernickei* foi originalmente descrita por Röber (1906), como *Metamorpha wernickei*, a partir de espécimes coletados nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. Röber (1906) diferencia *P. wernickei* de *P. dido* pela coloração dorsal das asas e pelas manchas submarginais difusas na primeira. Seitz (1913), por sua vez, a considera subespécie de *P. dido*. Fruhstorfer (1912) descreve *P. pygmalion*, como *Metamandana dido pygmalion*, e a diferencia de *P. wernickei* pela largura da banda mediana pós-discal, que na primeira apresenta-se mais fina.

Posteriormente, Brown & Mielke (1972) revalidam *P. wernickei*, removendo-a de *P. dido*, e consideram *P. pygmalion* uma subespécie da primeira, utilizando caracteres de genitália masculina e coloração das asas. Por fim, *P. pygmalion* recebe o status de espécie por Brown & Benson (1977), que justificam a decisão utilizando diferenças na coloração das larvas. Constantino & Salazar (2010) apresentam características nas asas e genitália masculina que sustentam a atual classificação, destacando-se os tamanhos relativos das bandas pós-discal interna e pós-discal mediana na face ventral das asas posteriores. Segundo estes autores, essas espécies ocorreriam em alopatria, sendo *P. wernickei* restrita a Mata Atlântica, e *P. dido* e *P. pygmalion*, a Amazônia brasileira. Ainda, que, *P. wernickei* apresenta relação entre tais bandas da asa de 1:1 e, *P. pygmalion*, de 1:0,5, ou menor.

Tanto Brown & Benson (1977) quanto Constantino & Salazar (2010), basearam-se em um número reduzido de amostras; ou seja, não avaliaram quantitativamente a variação desses caracteres ao longo das áreas geográficas de distribuição das espécies por eles propostas. Informações preliminares por nós obtidas em coleções entomológicas e coletas efetuadas, utilizando-se dos critérios de identificação propostos por Constantino & Salazar (2010), sugeriram que ao contrário do proposto por esses autores: 1) *P. dido*, *P. pygmalion* e *P. wernickei*, ocorreriam em simpatria, inclusive na Mata Atlântica brasileira e 2) apresentariam acentuada variação quanto a tais critérios de identificação, o que deve então ser revisto.

Dentre as filogenias existentes para a tribo somente duas investigaram as relações entre *P. pygmalion* e *P. wernickei*. Utilizando caracteres morfológicos e ecológicos de adultos, Brown (1981) estabelece um clado monofilético para *Philaethria*, com organização interna refletindo estreita relação entre estas duas espécies e *P. dido* sendo espécie-irmã de ambas. Penz (1999), por sua vez, ao utilizar caracteres morfológicos dos estágios imaturos e dos adultos destas espécies, obtém uma politomia, concluindo somente que formam um grupo monofilético.

Assim, diversas abordagens quantitativas e estatisticamente testáveis vêm sendo empregadas atualmente para investigar as diferenças entre espécies crípticas (ex., Villemant *et al.* 2007; Dasmahapatra *et al.* 2010; Ross *et al.* 2010). Porém, isso não tem ocorrido para identificar entidades tão próximas fenotipicamente existentes em *Philaethria*. Os resultados das filogenias e observações preliminares indicam a necessidade de avaliações quantitativas a respeito, sob maior abrangência amostral, de forma que ao menos parte da variabilidade fenotípica existente seja levada em consideração. Objetiva-se avaliar os caracteres que sustentam a separação de *P. pygmalion* e *P. wernickei* e realizar inferências sobre a evolução dessas espécies, a

partir de uma abordagem integrativa da morfologia clássica, morfometria linear e geométrica e biologia molecular.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material de estudo e dados de distribuição

As três espécies de *Philaethria*, cujas avaliações preliminares indicaram a presença na Mata Atlântica, foram incluídas no presente estudo: *Philaethria dido*, *P. pygmalion* e *P. wernickei*.

Os espécimes correspondentes (n = 500) pertencem às seguintes instituições: DZUP–Coleção Entomológica Pe. Jesus Moure, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil; KLAGESI–Reserva Particular do Patrimônio Natural Klagesi, Pará, Brasil; LMCI–Coleção de Tecidos, Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil; MAPA–Museu Anchieta de Ciências Naturais, Colégio Anchieta, Rio Grande do Sul, Brasil; MCTP–Museu de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil; MNRJ–Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; MPEG–Museu Parase Emílio Goeldi, Ministério da Ciência e Tecnologia, Pará, Brasil; MZSP–Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Uma lista completa do material analisado encontra-se no Apêndice 1, e as respectivas coordenadas geográficas, no Apêndice 2. Os dados de ocorrência contidos nas etiquetas de coleta foram utilizados para elaboração dos mapas de distribuição (Fig. 1). As localidades de coleta foram georreferenciadas a partir das bases de dados geoespaciais Global Gazetteer (Falling Rain Genomics 2007) e GLOSK

(2008). Os mapas foram gerados no programa Quantum GIS Geographic Information System (Quantum GIS Development Team 2010).

Dados morfológicos

Para a caracterização morfológica geral das genitálias dos machos de *P. dido*, *P. pygmalion* e *P. wernickei*, procedeu-se a dissecação dessas estruturas a partir de espécimes provenientes das coleções DZUP, LMCI e MNRJ (Apêndice 1). A escolha correspondente deu-se de forma a contemplar a maior parte das áreas de distribuição dessas espécies. As genitálias foram clarificadas em hidróxido de potássio (KOH) a 10% e preservadas em glicerina líquida. Procedeu-se análise em estereomicroscópio óptico Leica® M125 e fotografia das estruturas observadas. Após análise, o conjunto de estruturas foi acondicionado em tubo de vidro com glicerina líquida, etiquetado com o mesmo número de identificação do exemplar e depositado juntamente com este, na respectiva coleção. Os desenhos correspondentes foram realizados a partir das imagens digitalizadas, no software Adobe Illustrator (Adobe Illustrator Team 2008), com o auxílio de prancheta de digitalização.

Para descrição morfológica das ultraestruturas tegumentares das genitálias de machos, utilizaram-se espécimes conservados em álcool 70%, depositados na Coleção de Tecidos do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI-UFRGS). Procedeu-se a dissecação dessas estruturas sem a utilização de agentes químicos para evitar a corrosão de tecidos não esclerotinizados. Estas genitálias foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a preparação das amostras seguiu-se o protocolo padrão, que consiste em: desidratação em série alcoólica crescente, seguida de desidratação por ponto crítico (aparelho Bal-tec® CPD030),

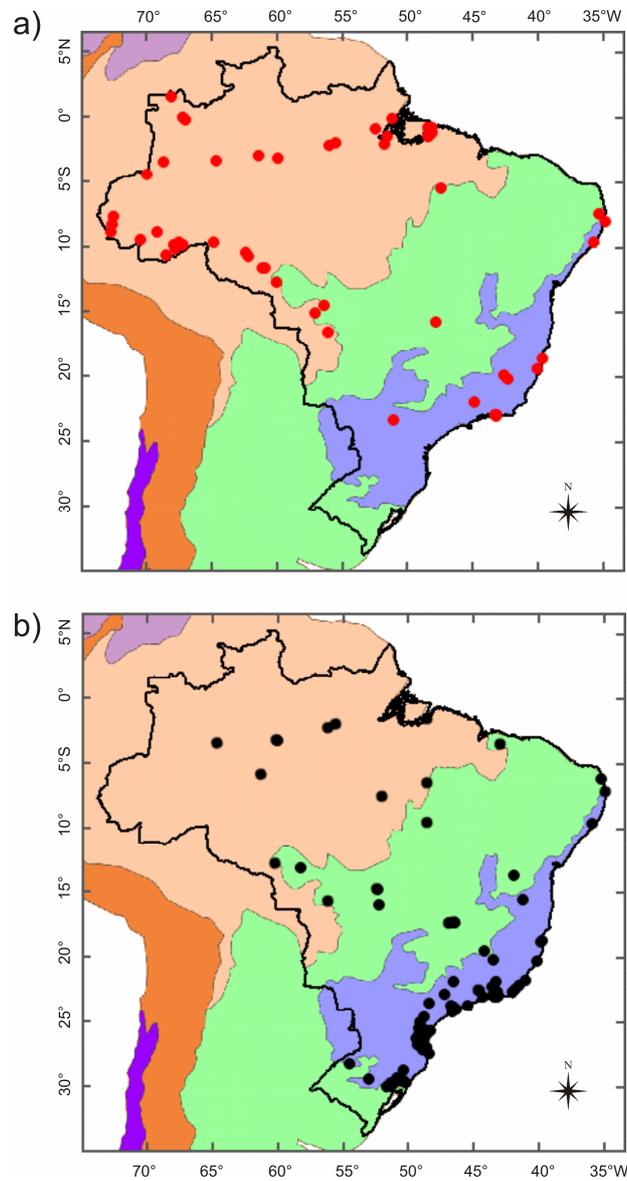


Figura 1. Distribuição de *Philaethria dido* (a) e *Philaethria wernickei* (b) no território brasileiro (demarcado por linha preta) em relação às subregiões biogeográficas propostas por Morrone (2006), onde, para o Brasil: azul = Paraná; verde = Chaquenha; salmão = Amazônica.

montagem sobre suporte metálico e metalização com ouro (aparelho Bal-tec® SCD050). A observação das estruturas e fotografia foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM5800.

Quanto à terminologia utilizada para a identificação das estruturas da genitália dos machos, seguiu-se Dias *et al.* (2010).

Dados morfométricos

Tanto para a análise referente à morfometria linear quanto geométrica, os espécimes foram fotografados, em vistas dorsal e ventral, com máquina fotográfica digital de 5.0 megapixels (2584x1938) de resolução, com função macro ativada e sem flash.

Morfometria linear

Os caracteres da asa posterior, que vem sendo utilizado historicamente para diferenciar *P. pygmalion* e *P. wernickei*, foram testados através de 288 espécimes (Apêndice 1), sendo 87 identificados previamente como *P. pygmalion* e 211 como *P. wernickei*. Foram utilizados os espécimes que apresentaram ao menos uma das asas intactas e de forma a abranger toda a região geográfica amostrada. Duas regiões da asa posterior foram quantificadas (Fig. 9a): em vista dorsal, a largura da banda pós-discal relativa ao comprimento (= AB/DE) e, em vista ventral, a largura da banda pós-discal mediana em relação ao tamanho da banda pós-discal interna (= EF/DF). Para a caracterização das regiões da asa seguiu-se a nomenclatura proposta por Constantino & Salazar (2010).

O comprimento da asa foi medido a partir do segmento da reta formada entre a origem das veias Subcostal (Sc) e Setor-radial (Rs), e a extremidade distal da Rs (Fig. 9a, pontos A e B, respectivamente). Em vista dorsal, a largura da banda pós-discal da asa posterior foi medida pelo segmento de reta entre os pontos D e E (Fig. 9a), obtido traçando-se uma reta entre o ponto B e a extremidade distal da veia Cubital 1 (Cu1; ponto C).

Em vista ventral (Fig. 9a'), foram medidos os segmentos de reta DF e EF, sobre o segmento BC, que delimitam, respectivamente a banda pós-discal mediana e a banda pós-discal interna.

Foram realizados testes *t* de Student ($\alpha=0,05$) para testar assimetria bilateral e dimorfismo sexual. Sendo a existência de ambos descartada, utilizou-se o tamanho médio das medidas realizadas. Os espécimes foram agrupados em cinco categorias de latitude ($^{\circ}$ S), de acordo com sua localidade de coleta: 1) 0 f 5; 2) 5 f 10; 3) 10 f 15; 4) 15 f 20; 5) 20 f 25; 6) 25 f 30. Análises de regressão linear foram realizadas entre as classes de latitude e o tamanho da asa, e as proporções AB/DE e EF/DF. Os resultados da distribuição de dados são apresentados em gráficos “boxplot”, com vistas a demonstrar a variação total encontrada através dos quartis correspondentes. Diferenças entre classes latitudinais foram exploradas por análises de Discriminante Linear (DL); para estimar a porcentagem de classificação correta, foi adotado um procedimento de validação cruzada, ou seja, foi assim avaliado o desempenho da classificação por DL. Todas as medidas lineares foram realizadas nas imagens digitalizadas com o software ImageJ (Rasband 2007).

Morfometria geométrica

Um total de 165 espécimes foi utilizado nas análises morfogeométricas, sendo 68 de *Philaethria dido*, 31 de *P. pygmalion* e 66 de *P. wernickei* (Apêndice 1). Foram utilizados os indivíduos que possuíssem um par de asas intactos e de forma a abranger toda a região geográfica amostrada. Um total de 34 marcos anatômicos do Tipo I foram selecionados, sendo 19 na asa anterior e 15 na posterior (Fig. 2; Tabela I). Os marcos anatômicos foram digitados para cada espécime pela mesma pessoa (K.R.Barão) utilizando-se o software TPSDig (Rohlf 2006). As coordenadas de cada marca anatômico em cada espécime foram sobrepostas utilizando-se o algoritmo de Sobreposição Generalizada de Procrustes (SGP) (Dryden & Mardia 1998), sendo cada asa tratada independentemente. O método SGP remove as diferenças não relacionadas com a forma, como escala, posição e orientação (Rohlf & Slice 1990; Rohlf & Marcus 1993; Bookstein 1996; Adams *et al.* 2004). As diferenças na forma das asas foram inferidas com base em regressões multivariadas das variáveis de forma nos eixos discriminantes.

Foram realizados testes *t* de Student ($\alpha=0,05$) sobre os resíduos da sobreposição de Procrustes, com uma sub-amostra de 20 indivíduos por espécie (10 machos e 10 fêmeas), para testar assimetria bilateral e dimorfismo sexual. Sendo a existência de ambos descartada, o par de asas menos danificado de cada espécime foi utilizado nas análises.

Primeiro, foi testada a existência de diferenças na forma entre *Philaethria dido*, *P. pygmalion* e *P. wernickei*. Segundo, não havendo diferenças entre *P. pygmalion* e *P. wernickei*, estes espécimes foram classificados por classes da proporção AB/DE e por categorias de latitude visando testar a existência de estruturas internas a *P. pygmalion + P. wernickei*. As classes de AB/DE foram denominadas de ‘a’ – ‘d’, e

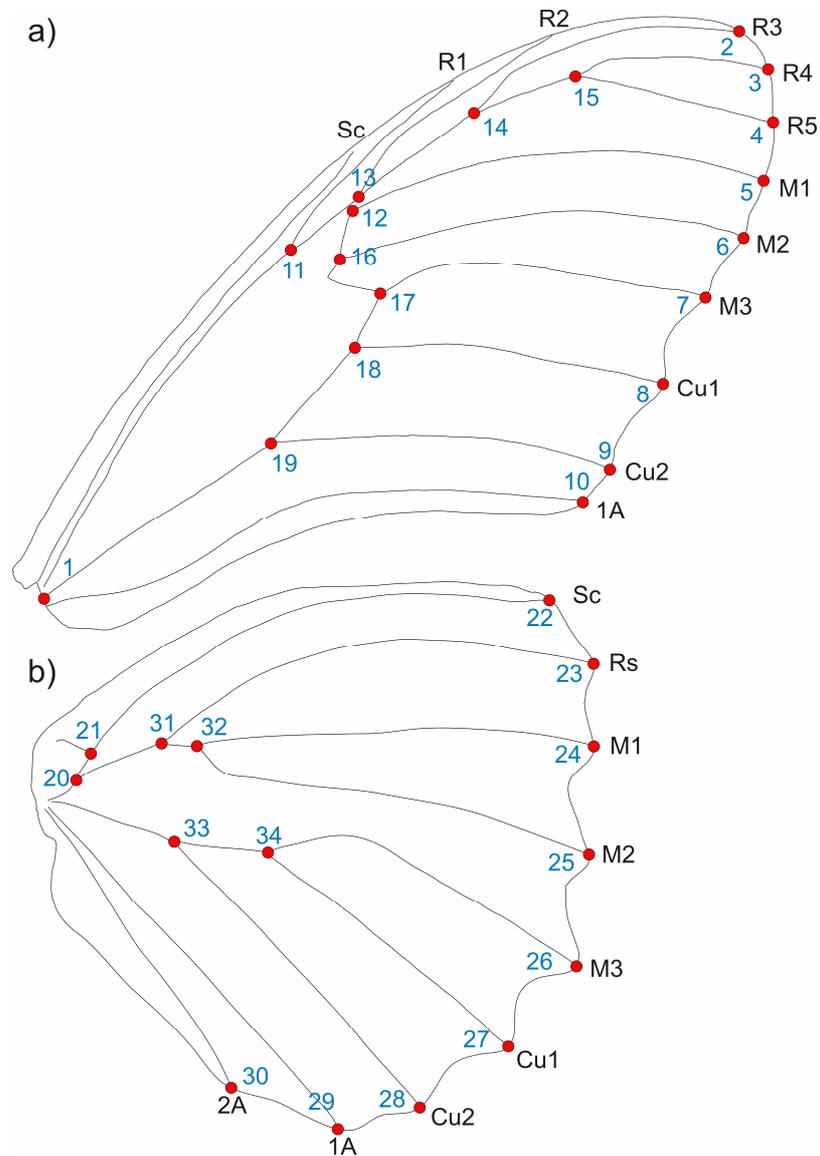


Figura 2. Localização dos marcos anatômicos (números em azul) nas asas anterior (a) e posterior (b) de *Philaethria*. Marcos anatômicos e veias, segundo sistema Comstock & Needham, são descritos na Tabela I.

TABELA I. Descrição dos marcos anatômicos das asas anteriores e posteriores de *Philaethria*.

	Marco anatômico	Descrição
Asa anterior	01	Base da veia humeral
	02	Extremidade distal da veia radial 3 (R 3)
	03	Extremidade distal da veia radial 4 (R 4)
	04	Extremidade distal da veia radial 5 (R 5)
	05	Extremidade distal da veia mediana 1 (M 1)
	06	Extremidade distal da veia mediana 2 (M 2)
	07	Extremidade distal da veia mediana 3 (M 3)
	08	Extremidade distal da veia cubital 1 (Cu 1)
	09	Extremidade distal da veia cubital 2 (Cu 2)
	10	Extremidade distal da veia anal 1 (A 1)
	11	Extremidade proximal da veia radial 1 (R 1)
	12	Extremidade proximal da veia mediana 1 (M 1)
	13	Extremidade proximal da veia radial 2 (R 2)
	14	Extremidade proximal da veia radial 3 (R 3)
	15	Extremidade proximal das veias radial 4 e 5 (R 4 e R 5)
	16	Extremidade proximal da veia mediana 2 (M 2)
	17	Extremidade proximal da veia mediana 3 (M 3)
	18	Extremidade proximal da veia cubital 1 (Cu 1)
	19	Extremidade proximal da veia cubital 2 (Cu 2)
Asa posterior	20	Intersecção entre as veias radial-subcostal (R 1 + Sc) e a veia setorial (Rs + M 1 + M 2)
	21	Extremidade proximal da veia humeral (hv)
	22	Extremidade distal da veia radial-subcostal (R 1 + Sc)
	23	Extremidade distal da veia setor radial (Rs)
	24	Extremidade distal da veia mediana 1 (M 1)
	25	Extremidade distal da veia mediana 2 (M 2)
	26	Extremidade distal da veia mediana 3 (M 3)
	27	Extremidade distal da veia cubital 1 (Cu 1)
	28	Extremidade distal da veia cubital 2 (Cu 2)
	29	Extremidade distal da veia anal 2 (2 A)
	30	Extremidade distal da veia anal 3 (3 A)
	31	Intersecção entre as veias radial (Rs) e medianas 1 e 2 (M 1 + M 2)
	32	Extremidade proximal das veias medianas 1 e 2 (M 1 + M 2)
	33	Extremidade proximal da veia cubital 2 (Cu 2)
	34	Extremidade proximal das veias mediana 3 (M 3) e cubital 1 (Cu 1)

representam uma escala crescente dessa proporção; ou seja, 'a' representa as maiores bandas pós-discais, enquanto 'd', as menores. Os três intervalos de latitude (°S) adotados foram determinadas de acordo com a localidade de coleta dos espécimes: 1) 0 ± 10; 2) 10 ± 20 e 3) 20 ± 30. Não houve indicativos de que os resultados se alterassem quando intervalos diferentes foram utilizados.

Para calcular a proximidade fenotípica entre espécies e grupos, foi realizada uma análise de Componentes Principais (CP) na matriz de variância-covariância dos resíduos de sobreposição de Procrustes. Os valores de CP resultantes foram utilizados como novas variáveis de forma, para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, assim como para efetuar a operação sobre variáveis independentes (Baylac & Friess 2005).

Diferenças entre espécies e grupos foram exploradas por análises de Discriminante Linear (DL), calculada sobre os CPs (Cordeiro-Estrela *et al.* 2006). Para estimar a porcentagem de classificação correta, foi adotado um procedimento de validação cruzada (Baylac *et al.* 2003); ou seja, foi assim avaliado o desempenho da classificação por DL.

Análises das deformações relativas (*Relative Warps Analysis* – RWA), com utilização de $\alpha=0$ (que dá igual peso aos componentes da análise), foram realizadas no programa TPSrelw (Rohlf 2008). As deformações relativas obtidas foram, então, graficamente representadas pela função *Thin Plate Splines* (TPS), cujos coeficientes correspondem aos escores das deformações parciais (Adams & Rosenberg 1998).

Todas as análises estatísticas e confecção de gráficos foram realizadas em linguagem e ambiente 'R' (R Development Core Team 2008), valendo-se das bibliotecas: *MASS* (Venables & Ripley 2002), *ape* (Paradis *et al.* 2004), *stats* (R

Development Core Team 2009), e *ade4* (Dray & Dufour 2007). Os procedimentos de morfometria geométrica foram desenvolvidos com o software RMORPH (Baylac 2008).

Dados moleculares

Extração, amplificação, seqüenciamento e alinhamento

Utilizou-se as três espécies abordadas neste estudo e mais *Philaethria diatonica* (Fruhstorfer, 1912), como grupo externo, em adição a *P. dido*, totalizando 24 indivíduos (Apêndice 1). Os espécimes foram escolhidos de forma a abranger a variação indicada nas análises morfológicas e estão depositados na Coleção de Tecidos do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos, preservados em álcool absoluto -20°C.

O DNA total foi extraído de tecido muscular dos espécimes supracitados utilizando Qiagen DNeasy Kit[®] utilizando protocolo proposto. Os produtos obtidos foram verificados em gel de agarose 1% revelado com Sybr Green[®] em Transluminador UV e armazenados em ultrafreezer -80°C.

Quatro genes foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), um de mtDNA e três de DNA nuclear. A região amplificada do mtDNA corresponde ao Citocromo Oxidase subunidade I (COI), o RNA de transferência de leucina (tRNA-leu) e o Citocromo Oxidase subunidade II (COII). Os genes nucleares amplificados foram *Th*, *Tpi* e *wingless*. Todos os marcadores foram amplificados para todos os indivíduos. Os pares de oligonucleotídeos (*primers*) utilizados encontram-se listados na Tabela II.

As reações da PCR seguiram as condições sugeridas na literatura (Kronforst *et al.* 2006; Beltrán *et al.* 2007) para cada um dos pares de oligonucleotídeos utilizados. Os produtos foram verificados em gel de agarose 1%, revelados com Sybr Green[®], e

TABELA II. Primers utilizados neste estudo.

Gene	Identificação	Posição	Seqüência (5' → 3')
Tpi	Tpi-1 ^a	F	GGT CAC TCT GAA AGG AGA ACC ATC TT
	Tpi-2 ^a	R	CAC AAC ATT TGC CCA GTT GTT GCC AA
Th	Th2	F	ATT ATA CTC TGA CCG AAG AAG
	Th2	R	TGT GTA GAT TGG AAA ACA CGG
wg	LepWG1 ^b	F	GAR TGY AAR TGY CAY GGYATG TCTGG
	LepWG2 ^b	R	ACT ICG CAR CAC CAR TGG AAT GTR CA
COI	Jerry ^c	F	CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG
	PatII ^c	R	TCC ATT ACA TAT AAT CTG CCA TAT TAG
	Ron ^c	F	GGT TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC
	MtD11 ^b	R	ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CA

^a Primer obtido de Beltrán *et al.* (2002); ^b Silva-Brandão *et al.* (2008); ^c Caterino e Sperling (1999).

purificados com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e Exonuclease I. Os produtos resultantes foram utilizados diretamente na reação de seqüenciamento realizado no Northwest Labs, FAS (Faculty of Art and Sciences, Harvard University) em Cambridge, Massachussets, EUA.

Os fragmentos purificados foram seqüenciados em ambos os sentidos utilizando os mesmos *primers* da PCR. Para isso foi utilizado o kit de terminadores marcados no seqüenciador automático ABI (Applied Biosystems) do laboratório citado. O alinhamento das seqüências obtidas foi feito automaticamente no programa CodonCode Aligner© (CodonCode Corporation 2010) e corrigidas manualmente através da verificação de todos os sítios variáveis, confrontando-se as seqüências em ambos os sentidos e conferindo-se os cromatogramas, com o intuito de minimizar os possíveis erros na leitura do seqüenciamento.

Análise dos dados

Após a edição das seqüências foi obtido o alinhamento de 1259 pares de bases (pb) para COI, 761 pb para *Th*, 390 pb para *Tpi* e 453 pb para *wg*, totalizando 2863 pb. O modelo de substituição nucleotídica para as reconstruções filogenéticas foi estimado utilizando os programas Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998) e MrModeltest 2.3 (Nylander 2004), seguindo o critério de informação de Akaike (AIC).

Foi estimada a filogenia das espécies utilizando-se os métodos de máxima verossimilhança (MV) e bayesiana através dos programas PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) e MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), respectivamente. A inferência Bayesiana foi desenvolvida com um milhão de ciclos do algoritmo da cadeia de Markov e Monte Carlo (*Markov chain Monte Carlo*; MCMC) utilizando os *priors* padrão. A

probabilidade posterior foi calculada descartando as primeiras árvores amostradas após o valor de *log-likelihood* ter sido estabilizado. Para análise de MV foi estimado 1000 replicações de *bootstrap*. As árvores de MV foram construídas com a opção de busca heurística *tree-bisection-reconnection* (TBR) e uma árvore inicial de *neighbour-joining*; a confiança foi estimada por *bootstrap* usando a opção de busca heurística de *nearest-neighbour interchange* (NNI).

Para avaliar as relações evolutivas entre as seqüências o programa DnaSP 5.0 (Librado & Rozas 2009) foi utilizado para obtenção dos haplótipos para cada um dos genes e, então, foram construídas redes de haplótipos utilizando o método de *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999), com o programa NETWORK 4.1 (www.fluxusengineering.com).

Parâmetros populacionais, tais como distância genética, coeficiente de diferenciação (F_{ST} ; Hudson *et al.* 1992) e diversidade haplotípica foram calculados nos programas DnaSP 4.0 e ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

3.4 RESULTADOS

Morfologia da genitália masculina

Philaethria dido (Figs. 3a-c)

Tegume triangular em vista lateral, arredondado dorsal e anteriormente (Fig. 4a). Agregações de escamas presentes na região mediana e próximo ao unco. Braços do tegume e do saco fusionados (Fig. 4a). Em vista lateral, projeção anterior do saco desenvolvida, alongada e afilada no ápice (Fig. 4a). Unco delgado em vista lateral, região basal fusionada ao tegume; ápice distal afilado e com microcerdas de número e forma da base, variáveis (Figs. 5d-e). Braços do gnato articulam-se com tegume e unco

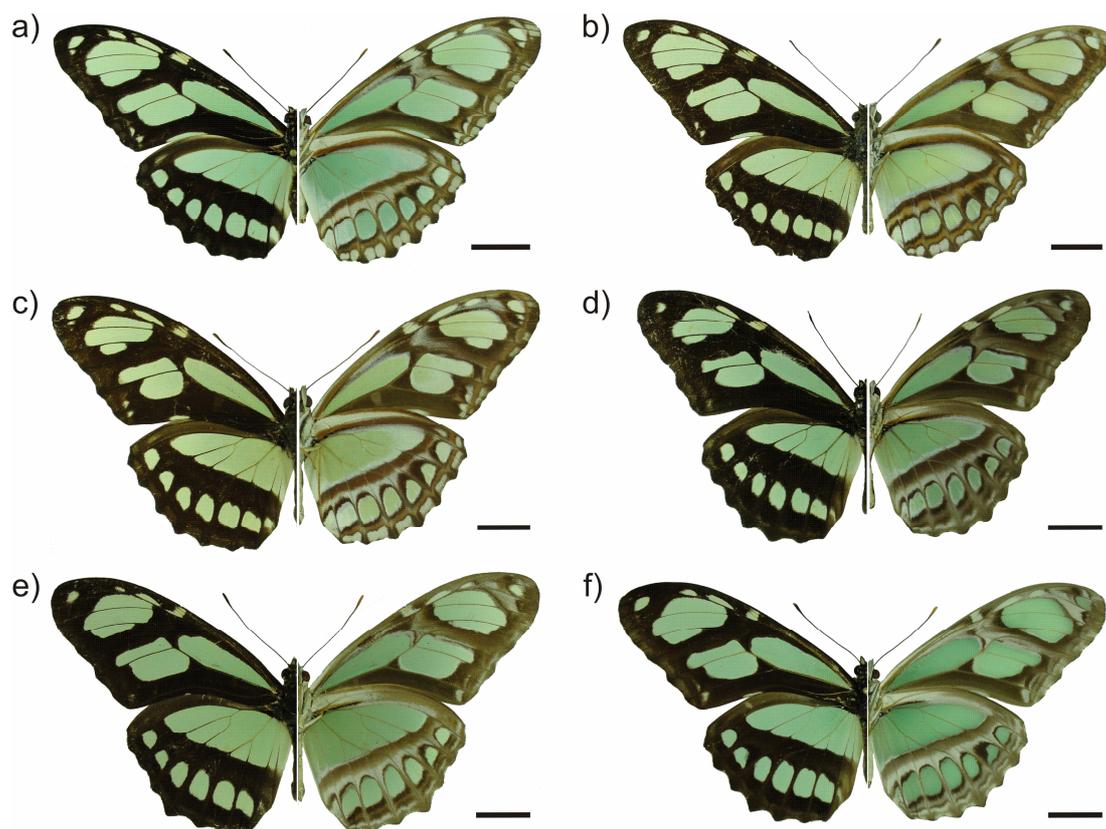


Figura 3. Variação de *Philaethria dido* (a-c) e *Philaethria wernickei* (d-f) em diferentes localidades no Brasil. a, Alto Alegre, Roraima; b, Recife, Pernambuco; c, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; d, Santarém, Pará; e, Jacarepaguá, Rio de Janeiro; f, São Bento do Sul, Santa Catarina. Barras = 1 cm.

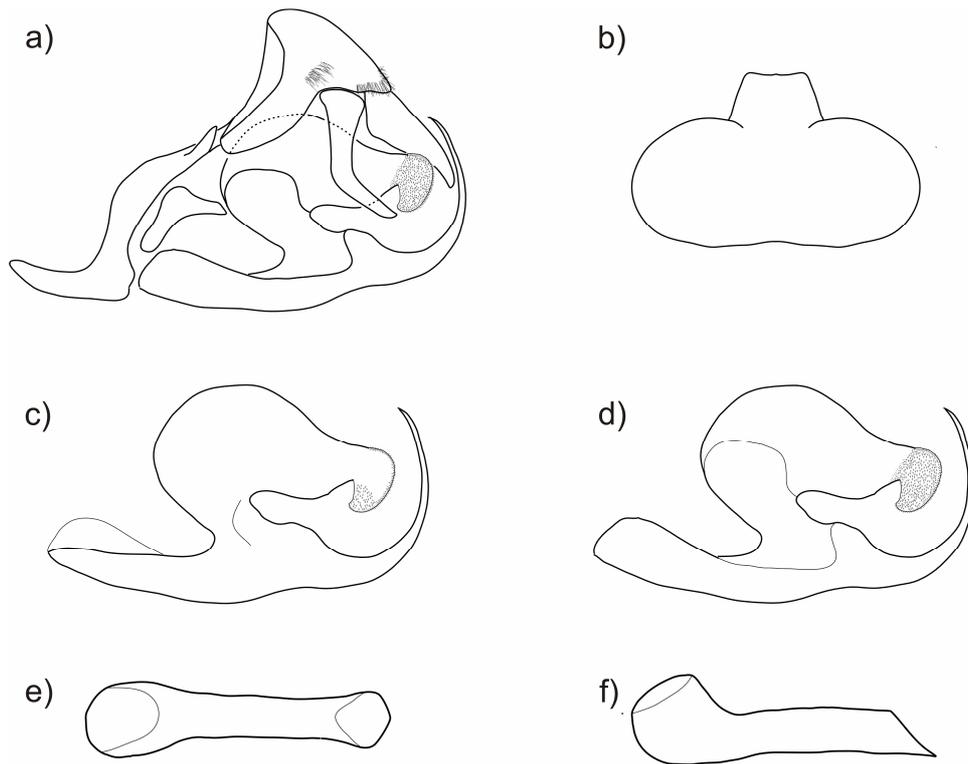


Figura 4. Genitália masculina de *Philaethria dido*. a, vista lateral esquerda interna; b, fultura inferior, vista ventral; c, valva esquerda, vista externa; d, valva esquerda, vista interna; e, edeago, vista dorsal; f, edeago, vista lateral esquerda.

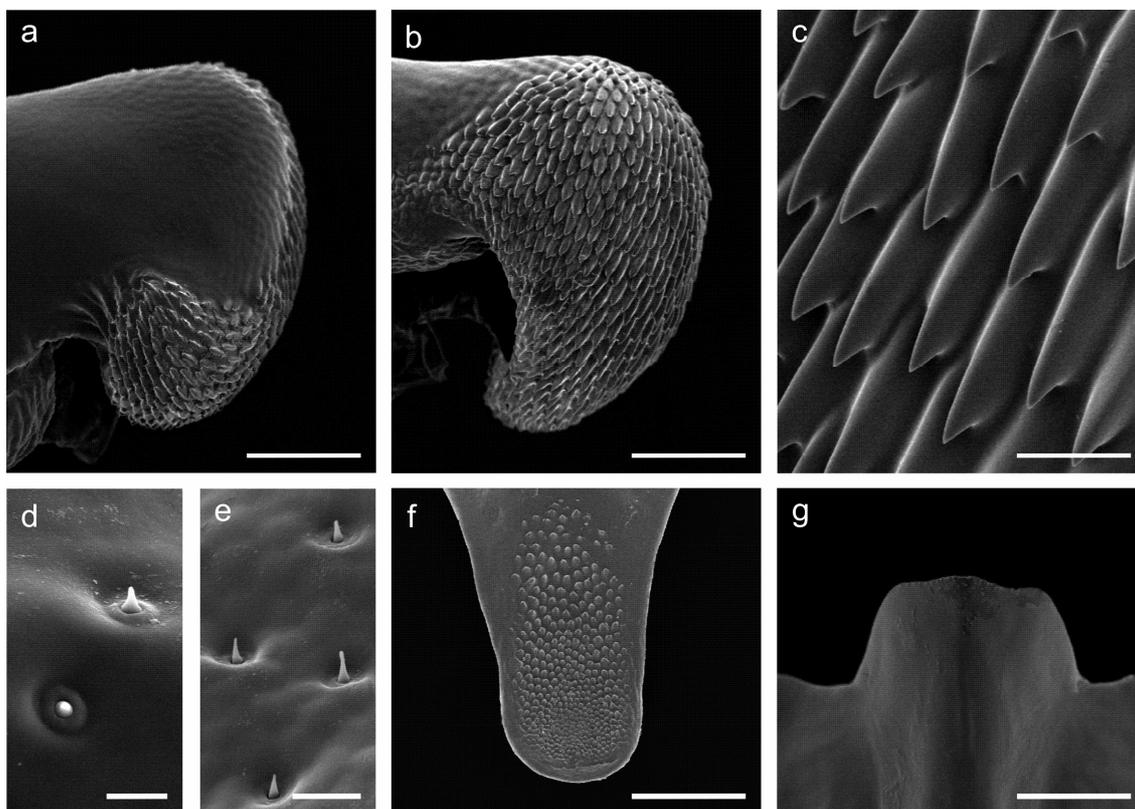


Figura 5. Genitália masculina de *Philaethria dido* em microscopia eletrônica de varredura. a, crista valvar, vista lateral externa; b, crista valvar, vista lateral interna; c, detalhe da crista valvar; d-e, micro cerdas da região distal do unco; f, detalhe da região distal do gnato, vista dorsal; g, detalhe da região posterior da fultura inferior, vista ventral. Barras = 150, 150, 30, 5, 10, 200, 100 μm , respectivamente.

e projetam-se ventralmente; porção distal fusionada e com microtríquias arredondadas em vista dorsal (Fig. 5f). Em vista ventral, é nítida a sutura que delimita a fusão dos braços laterais do gnato.

Valva com gancho basal longo, curvado dorsal e anteriormente, atingindo a região mediana do unco (Figs. 4c-d); costa da valva com projeção posterior arredondada e ornamentada com microtríquias em forma de espinhos (Fig. 5c), que se restringem a região ventral, em vista lateral externa (Figs. 4c, 5a) e, em vista lateral interna, cobrem toda esta região (Figs. 4d, 5b).

Edeago cilíndrico e esclerotizado (Figs. 4e-f). Porção anterior dilatada, com abertura dorsal, de onde se projeta o bulbo ejaculatório. Porção posterior truncada. Exofalo é sustentado ventralmente pela fultura inferior (Fig. 4b), de formato triangular, com projeção posterior truncada e ornamentada por microtríquias arredondadas (Fig. 5g).

Philaethria wernickei (Fig. 3d-f)

Tegume triangular em vista lateral, arredondado dorsal e anteriormente, com escamas presentes na região mediana e próximo ao unco (Fig. 6a). Braços do tegume e do saco fusionados. Projeção anterior do saco, em vista lateral, desenvolvida, alongada e projetada dorsalmente, afilada no ápice (Fig. 6a). Unco delgado em vista lateral, região basal fusionada ao tegume; ápice distal afilado e com microcerdas de base variável, apresentando ou não base dilatada (Figs. 7d-e). Braços do gnato se articulam com o tegume e unco e projetam-se ventralmente; porção distal fusionada e com esculturações em vista dorsal (Fig. 7f).

Valva com gancho basal longo, curvado dorsal e anteriormente, atingindo o

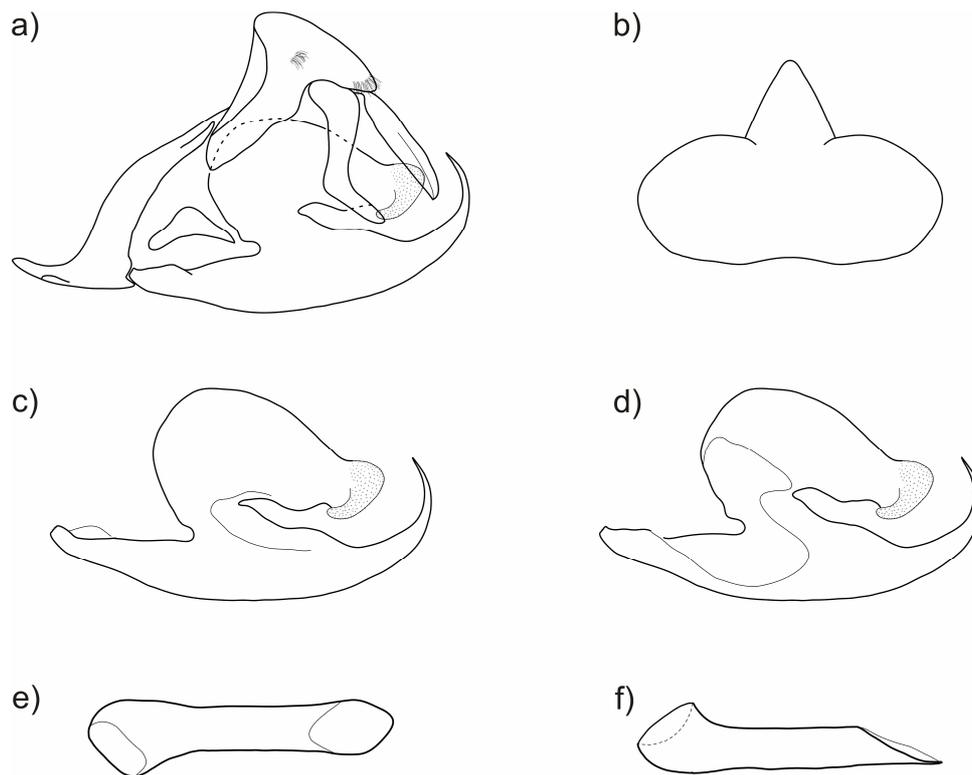


Figura 6. Genitália masculina de *Philaethria wernickei*. a, vista lateral esquerda interna; b, fultura inferior, vista ventral; c, valva esquerda, vista externa; d, valva esquerda, vista interna; e, edeago, vista dorsal; f, edeago, vista lateral esquerda.

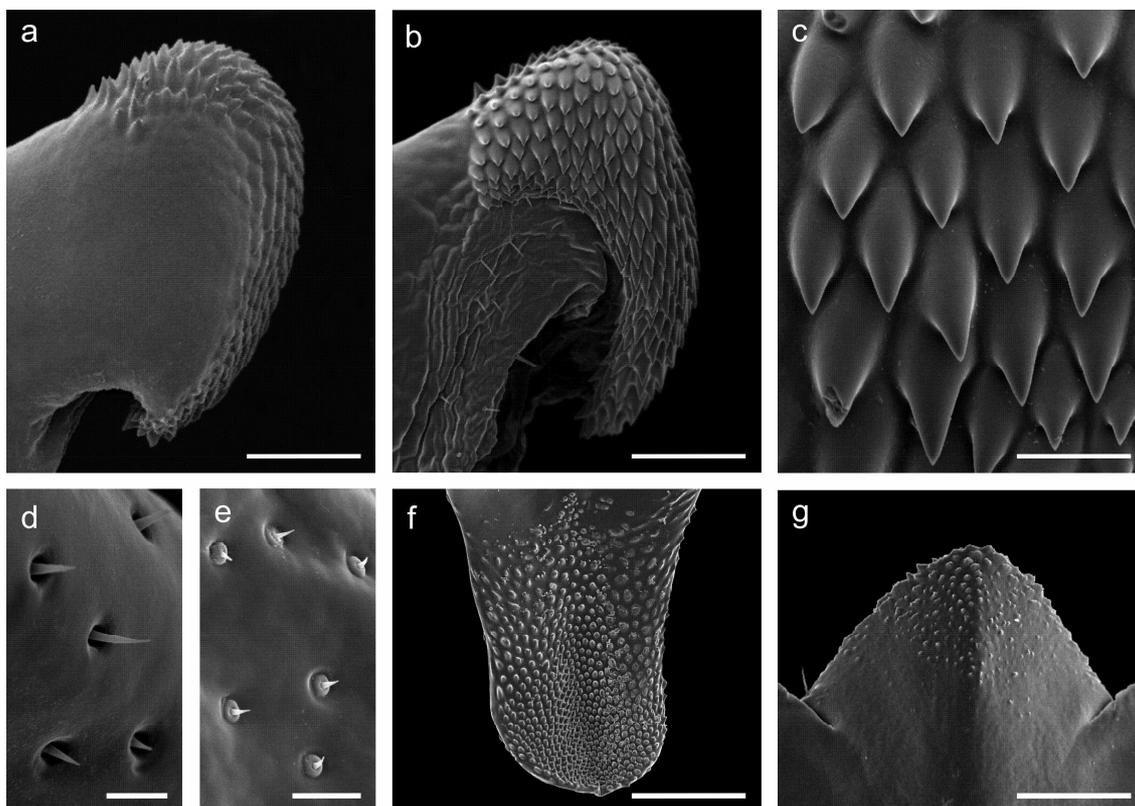


Figura 7. Genitália masculina de *Philaethria wernickei* em microscopia eletrônica de varredura. a, crista valvar, vista lateral externa; b, crista valvar, vista lateral interna; c, detalhe da crista valvar; d-e, micro cerdas da região distal do unco; f, detalhe da região distal do gnato, vista dorsal; g, detalhe da região posterior da fultura inferior, vista ventral. Barras = 150, 150, 30, 5, 10, 150, 100 μm , respectivamente.

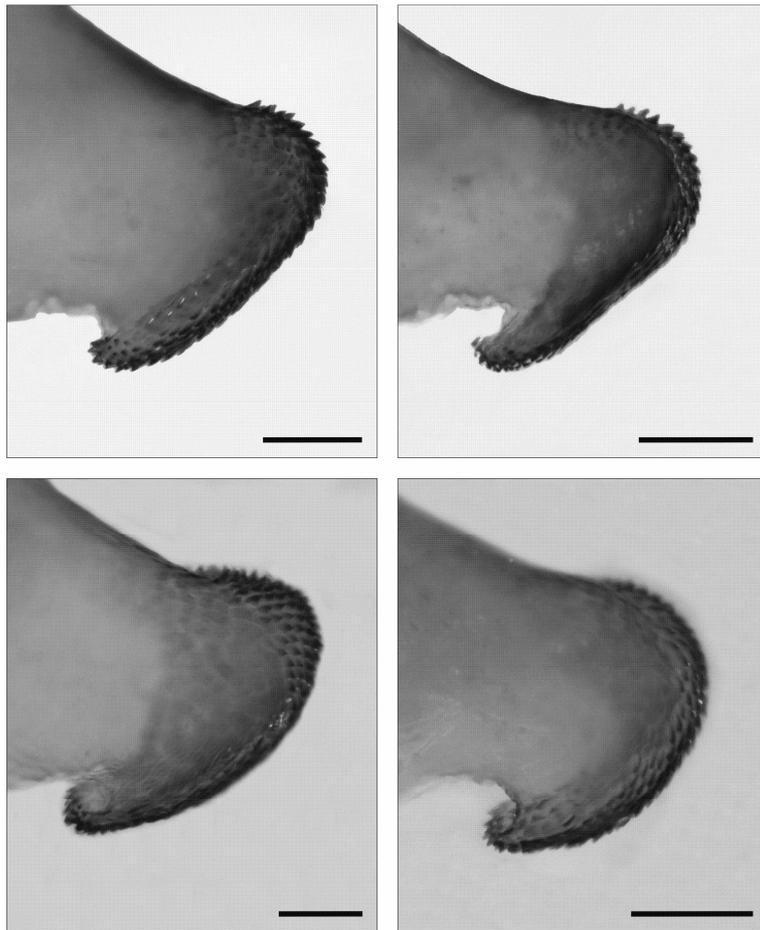


Figura 8. Variações da crista valvar de *Philaethria wernickei*. Barras = 100 μm .

terço distal do unco (Figs. 6c-d); costa da valva arredondada, com projeção posterior arredondada e ornamentada com microtríquias em forma de espinho (Fig. 7c). Esta região é variável quanto à forma e presença de espinhos (Fig. 8), os quais são menos numerosos em vista lateral externa (Fig. 7a) do que interna (Fig. 7b).

Edeago cilíndrico e esclerotizado (Figs. 6e-f). Porção anterior dilatada, com abertura dorso-anterior, de onde se projeta o bulbo ejaculatório. Porção posterior afilada. Sustentando ventralmente o edeago, a fultura inferior (Fig. 6b), triangular, com projeção posterior triangular, afilada e ornamentada com microtríquias (Fig. 7g).

Philaethria pygmalion

Apresentou variação nas características da genitália dentro do intervalo descrito e ilustrado acima para *P. wernickei*.

Morfometria linear

Considerando o resultado anterior e a ausência de indicativos posteriores, agrupou-se *P. pygmalion* e *P. wernickei*, que doravante serão denominadas *P. wernickei*, a menos que seja necessário destacá-las.

O comprimento da asa posterior de *Philaethria wernickei* (Fig. 9b) diminuiu significativamente com o aumento da latitude ($y = -0,0113x + 3,2093$; $R^2 = 0,1581$; $p < 0,0001$; $n = 288$). Contudo, houve uma sobreposição deste parâmetro entre todos os intervalos de latitude (Fig. 9b).

Os dados quanto a proporção AB/DE (Figs. 9c, 10) indicaram a existência de uma variação contínua e crescente desta característica ao longo da distribuição

Figura 9. Morfometria linear da asa posterior de *Philaethria wernickei* em relação à latitude. a, caracterização dos vetores mensurados em vista dorsal e ventral (detalhe pontilhado); b, variação no comprimento da asa (AB); c, variação da relação entre o comprimento da asa posterior e a largura da banda pós-discal (AB/DE); d, variação da relação entre a largura da banda pós-discal mediana e a largura da banda pós-discal interna (EF/DF). *Box plots* indicam medianas e respectivos quartis. Números sobre as barras em **b**, representam o tamanho amostral.

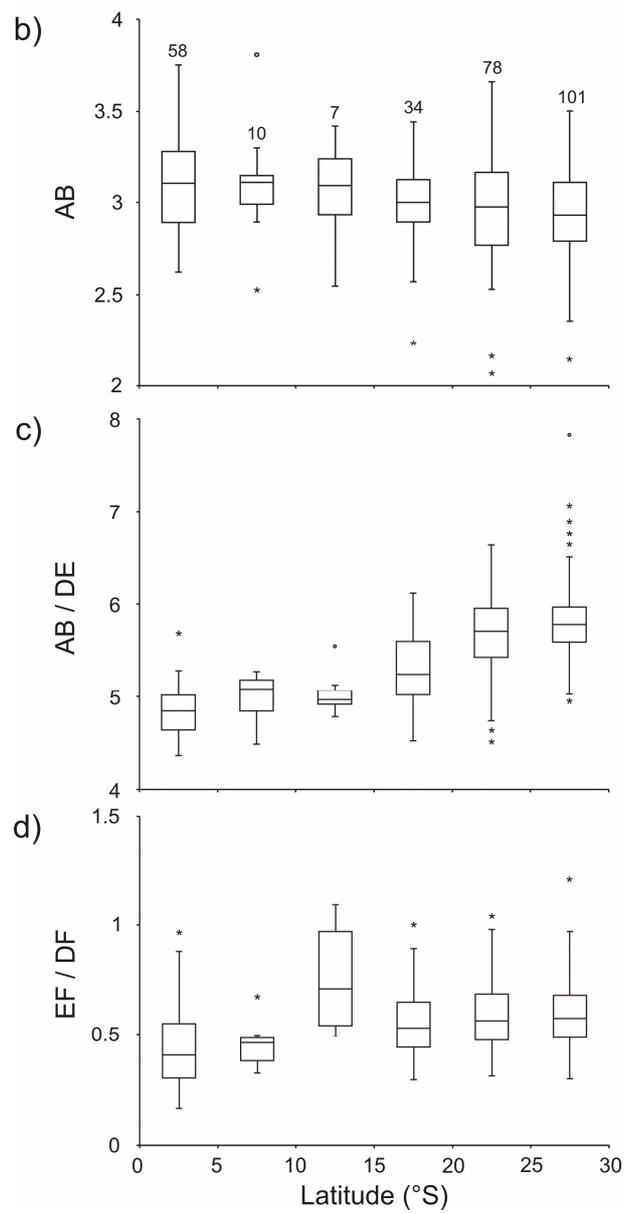
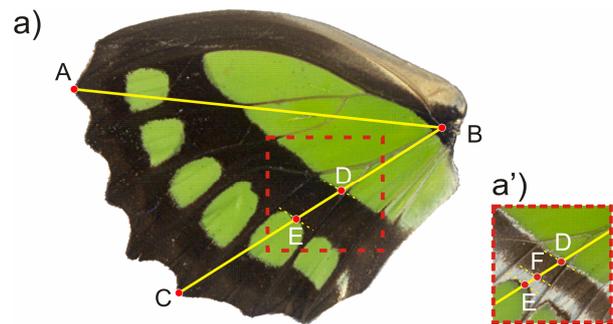




Figura 10. Variação de largura da banda pós-discal nas asas posteriores de *Philaethria wernickei*, em vista dorsal. Barras = 1 cm.

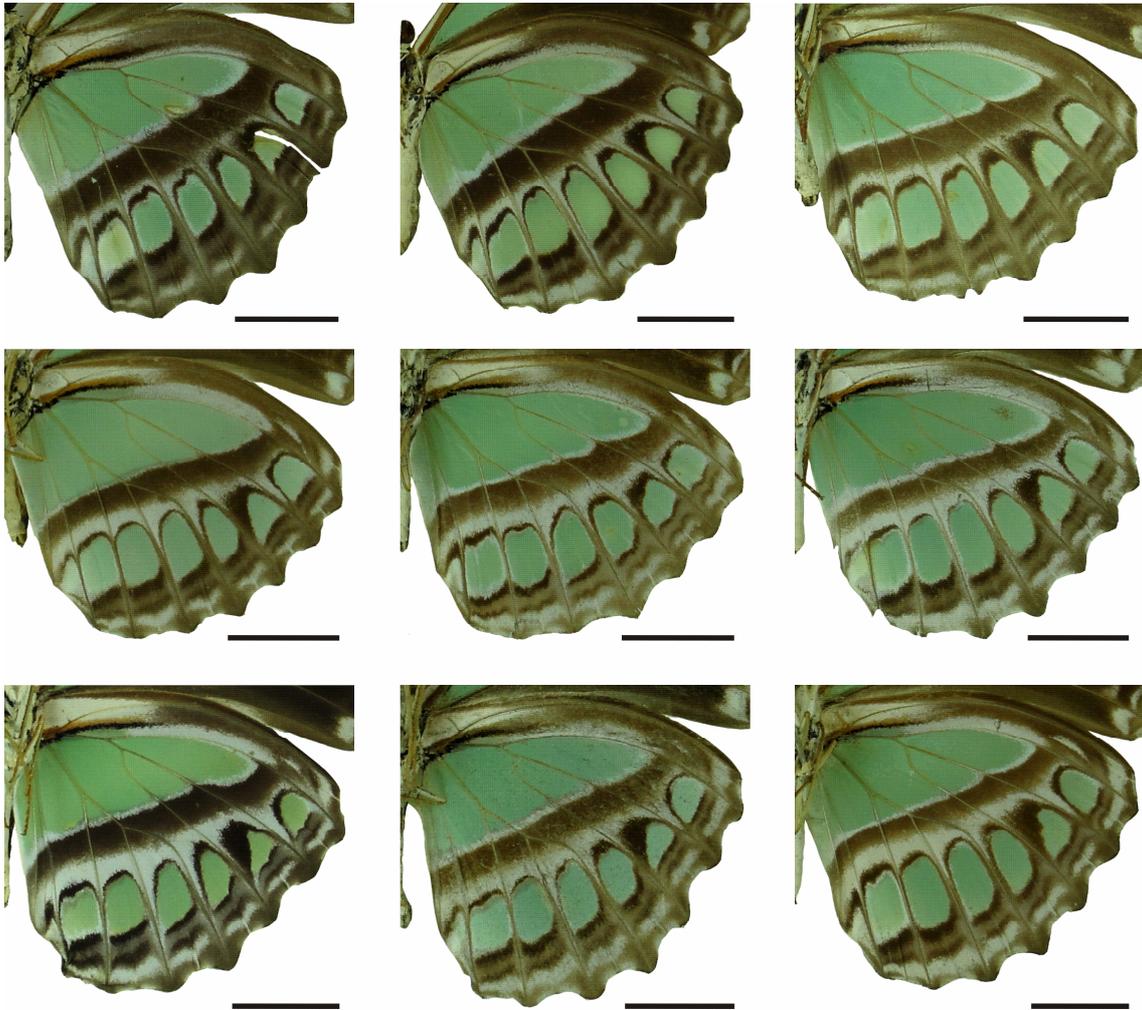


Figura 11. Variação de largura da banda pós-discal mediana e pós-discal interna nas asas posteriores de *Philaethria wernickei*, vista ventral. Barras = 1 cm.

latitudinal ($y = 0,0602x + 4,5688$; $R^2 = 0,4944$; $p < 0,0001$; $n = 288$). A proporção EF/DF (Figs. 9d, 11) também aumentou progressivamente com o aumento da latitude ($y = 0,0064x + 0,4377$; $R^2 = 0,1164$; $p < 0,0001$; $n = 288$). Porém, a variação total dos dados para ambas as proporções (Figs. 9c,d) demonstrou a existência de uma completa sobreposição destes entre todas as classes latitudinais.

Os índices de classificação correta, inferidos por DL com validação cruzada, a partir dos espécimes identificados por sua respectiva classe de latitude para os três parâmetros apresentados acima foi 37, 44 e 31%, respectivamente.

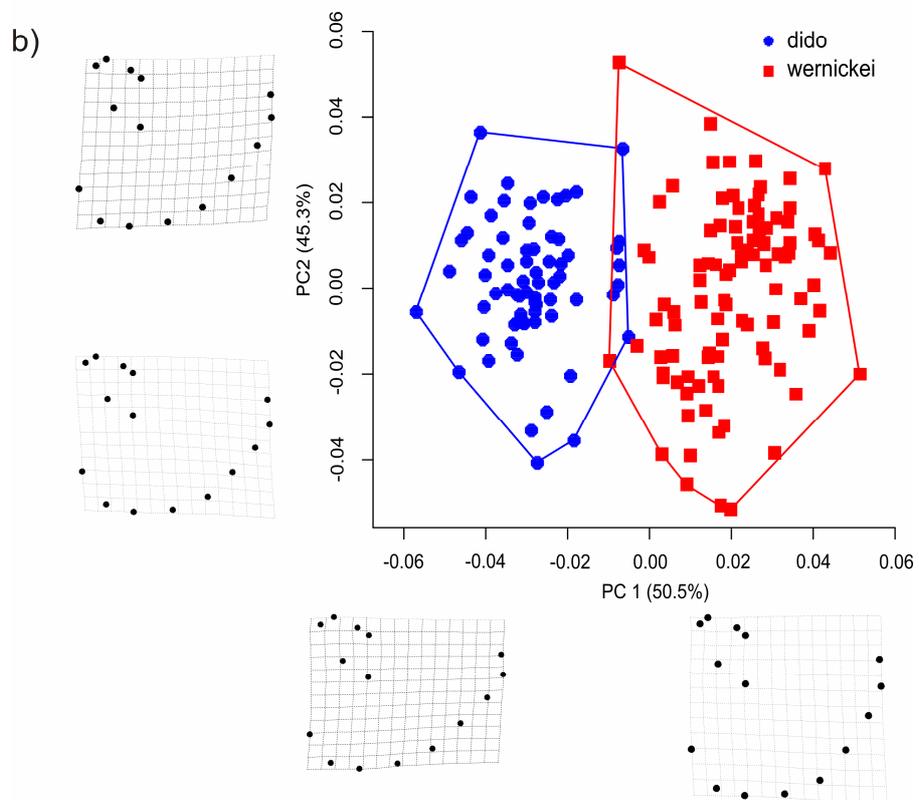
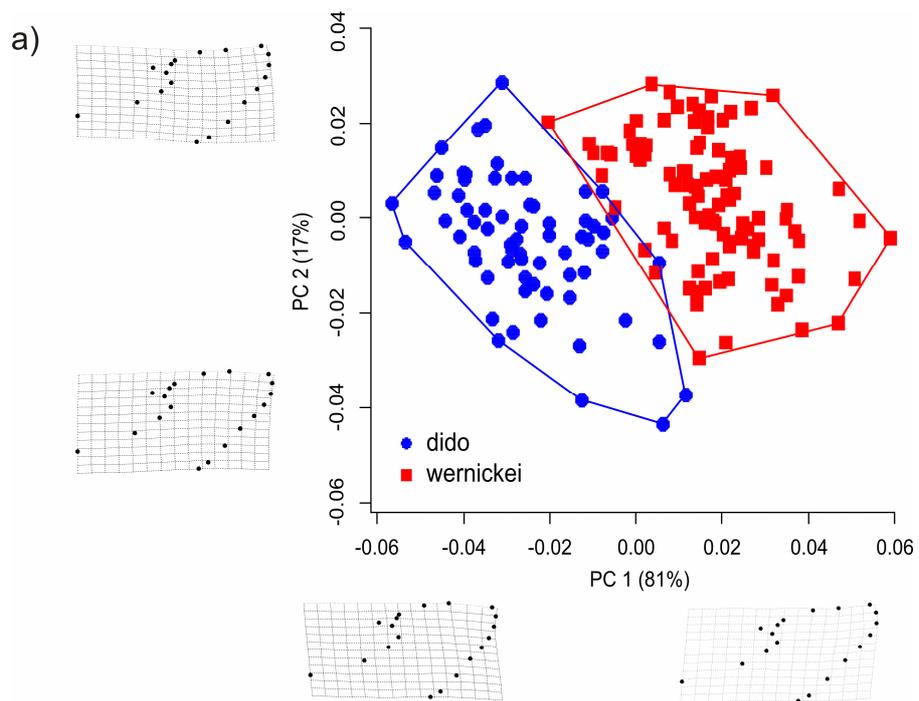
Morfometria geométrica

***P. dido* x *P. wernickei* (= *P. wernickei* + *P. pygmalion*)**

As análises de ordenamento dos componentes principais (PC) para comparação da forma das asas anteriores (Fig. 12a) e posteriores (Fig. 12b) entre *P. dido*, *P. wernickei* e *P. pygmalion* mostraram que os dois primeiros componentes principais explicam mais de 95% da variação da forma. PC1 distinguiu por agrupamentos distintos a forma das asas anterior e posterior de *P. dido* das asas de *P. pygmalion* + *P. wernickei*. Porém, não diferenciou as asas anteriores e posteriores de *P. pygmalion* de *P. wernickei*. PC2 não demonstrou distinção entre as espécies analisadas.

A porcentagem de classificação correta pela DL foi de 100% para *P. dido* e *P. wernickei* + *P. pygmalion*. Dentre *P. wernickei* e *P. pygmalion* a porcentagem de classificação correta foi inferior a 60%.

Figura 12. Ordenamento de *Philaethria dido* (pontos azuis) e *P. wernickei* (pontos vermelho) nos componentes 1 e 2 das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para a forma da asa anterior (a) e da asa posterior (b). Entre parênteses, encontram-se as percentagens de variância explicadas por cada eixo. Gráficos inseridos abaixo do eixo X e ao lado do eixo Y representam as deformações máximas e mínimas relativas à forma média dos marcos anatômicos em cada componente principal, visualizadas através da função *thin plate splines*.



***P. wernickei* (= *P. wernickei* + *P. pygmalion*)**

Os PC 1 e 2 explicaram mais de 95% da variação de forma das asas anteriores e posteriores quando os espécimes são identificados por classes de latitudes (Fig. 13a-b). Entretanto, nenhum dos dois PCs permitiu diferenciar as classes de latitude correspondente. A classificação correta por LDA dos espécimes por classes de latitude foi de 56.7% para asa anterior e de 65.97% para a posterior.

A classificação dos espécimes, pelo critério de agrupamento de largura da banda pós-discal obtido pela morfologia linear, também não permitiu separá-las, embora os PCs 1 e 2 explicassem mais de 95% da variação da forma das asas anterior e posterior (Fig. 14a-b). LDA resulta em 39 e 57% de classificação correta para o uso da asa anterior e posterior a respeito, respectivamente.

Dados moleculares

Caracterização dos dados nucleotídicos

Foram obtidos 1259 pares de bases de mtDNA para 23 espécimes; não se obteve seqüências para dois indivíduos de *P. wernickei*. Da totalidade de sítios examinados, 8.5% foram variáveis e, 6.98%, informativos (Tab. III).

Foram obtidas seqüências de 453, 390 e 761pb para os genes nucleares *wg*, *Tpi* e *Th*, respectivamente (Tab. III). Somente *Tpi* apresentou indels. Não se obteve seqüência de *P. diatonica* para *wg*; as demais seqüências faltantes correspondem a indivíduos de *P. wernickei* (Tab. III).

Dos três genes amostrados, *Tpi* foi o que apresentou o maior número de sítios variáveis (15%) e, conseqüentemente, maior numero de sítios informativos (7.4%). A

Figura 13. Ordenamento de *Philaethria wernickei* por intervalos de latitude nos componentes 1 e 2 das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para a forma da asa anterior (a) e da asa posterior (b). Entre parênteses as percentagens de variância explicadas por cada eixo. Gráficos inseridos abaixo do eixo X e ao lado do eixo Y representam as deformações máximas e mínimas relativas à forma média dos marcos anatômicos em cada componente principal, visualizadas através da função *thin plate splines*.

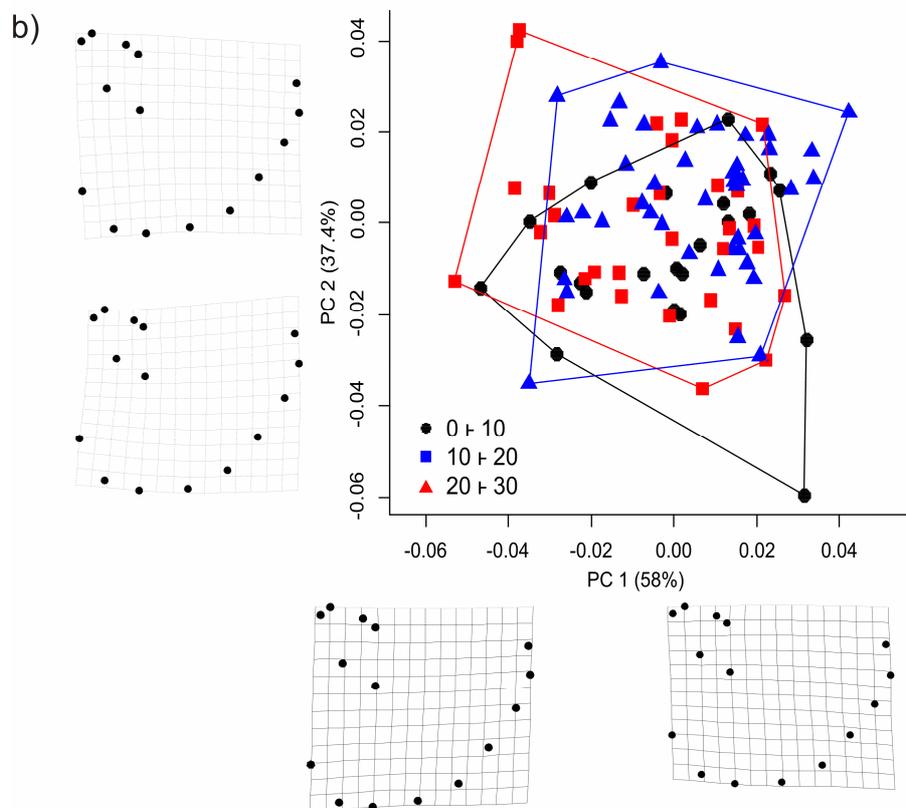
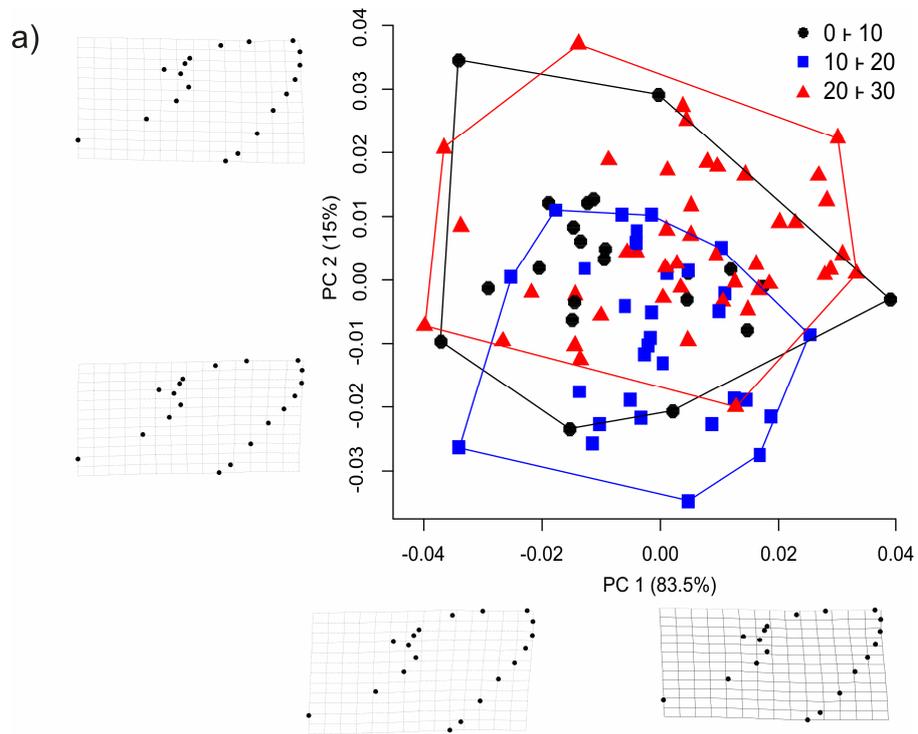


Figura 14. Ordenamento de *Philaethria wernickei* por categoria de proporção AB/DE conforme análise morfológica linear, nos componentes 1 e 2 das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para a forma da asa anterior (a) e da asa posterior (b). Entre parênteses, encontram-se as percentagens de variância explicadas por cada eixo. Gráficos inseridos abaixo do eixo X e ao lado do eixo Y representam as deformações máximas e mínimas relativas à forma média dos marcos anatômicos em cada componente principal, visualizadas através da função *thin plate splines*.

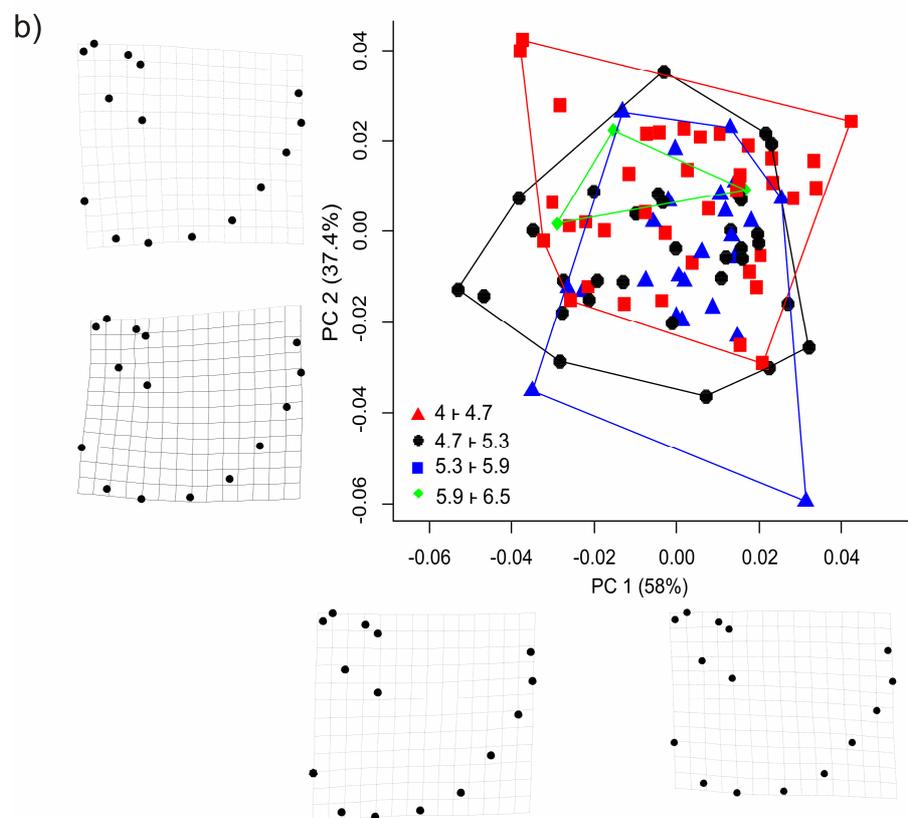
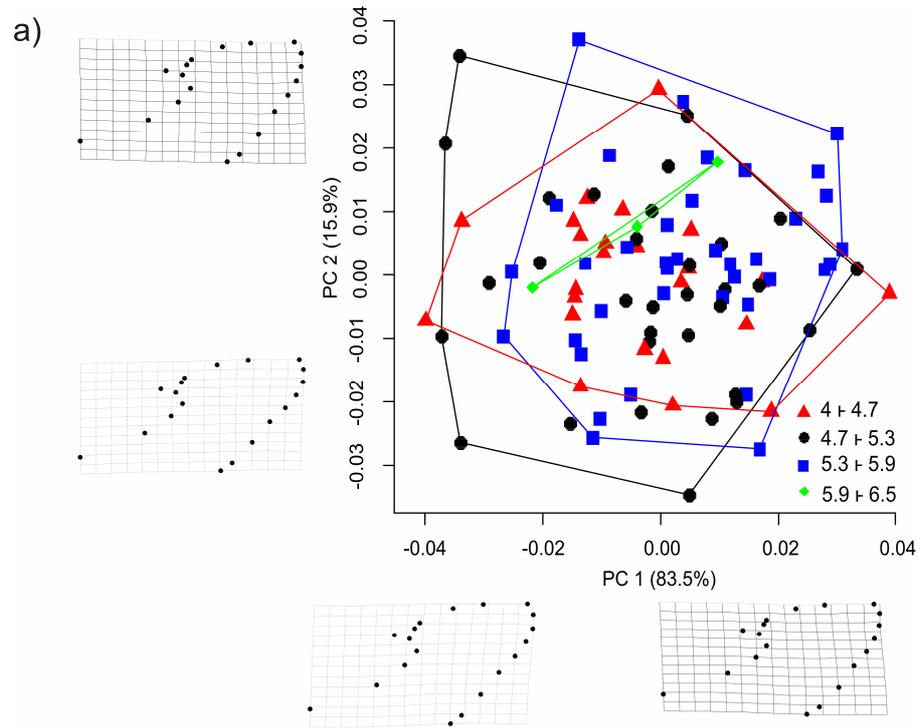


TABELA III. Caracterização das seqüências.

Gene	Número de seqüências	Tamanho	Sítios informativos	Sítios parcimônia informativos	Composição de bases				Modelo evolutivo
					T	C	A	G	
COI	23	1259	108	88	30.1	12.9	41.6	15.3	GTR+I
Tpi	18	390	59	29	35.2	20.3	32.5	12.0	HKY+G
wg	19	453	10	6	23.5	28.6	22.5	25.4	K80
Th	24	761	15	6	25.9	21.1	22.7	30.3	GTR
Tpi+wg+Th	24	1580	77	38	27.0	23.1	24.4	25.6	GTR+I
COI+Tpi+wg+Th	23	2839	183	115	28.4	18.2	32.6	20.7	GTR+I

variação em *wg* e *Th* foi próxima (2,2 e 1,9%, respectivamente), bem como a de sítios informativos (1,32 e 0,78%, respectivamente).

O conjunto de dados total contém 2839 nucleotídeos (1259 mitocondriais + 1580 nucleares). As seqüências de cada indivíduo foram submetidas ao GenBank e aguardam número de acesso.

Modelos de evolução de seqüência

Houve pouca variação entre os modelos de seqüência evolutiva selecionados para cada gene (Tab. III), bem como para a combinação dos dados nucleares e mitocondriais e nucleares. Assim, inferiu-se a ausência de incongruência na concatenação dos dados para reconstrução da árvore filogenética.

Análises filogenéticas

A topologia dos filogramas obtidos pelos dois métodos de inferência filogenética são similares (Figs. 15-20), sustentando um clado monofilético sem estruturação interna definida, composto por *P. pygmalion* e *P. wernickei*. A inferência Bayesiana suporta este clado com 100% de probabilidade posterior (exceto para *Th*, 99%). Já por máxima verossimilhança (MV), o clado é suportado com *bootstrap* de 100% na maior parte dos conjuntos de dados, exceto *wg* (97%) e *Th* (67%). Os espécimes de *P. dido* e *P. diatonica* posicionam-se sempre externas a esse clado, porém as relações não são resolvidas. Os filogramas individuais para cada gene são ilustrados nas Figs. 15-18 e, as hipóteses com todos os genes nucleares e com os genes nucleares e mitocondriais concatenados, nas Figs. 19-20, respectivamente.

A árvore filogenética obtida para *wg* (Fig. 15) demonstrou um clado com baixos valores de suporte (68% BA, <50% MV), para a maior parte dos espécimes de *P. pygmalion* e *P. wernickei*, tendo o indivíduo 94-08 externo a este. Já a de *Tpi* (Fig. 16), indicou diversos clados internos a (*P. pygmalion* + *P. wernickei*), com valores de suporte inferiores a 80% de probabilidade BA e, por MV, sempre inferiores a 50% por *bootstrap*. A inferência BA para *Th* (Fig. 17a) foi muito próxima a recuperada para *wg*, formando um clado sem estruturação interna com *P. pygmalion* e *P. wernickei*; MV (Fig. 17b), por sua vez, indicou alguns clados internos com valor de suporte por *bootstrap* inferiores a 50%.

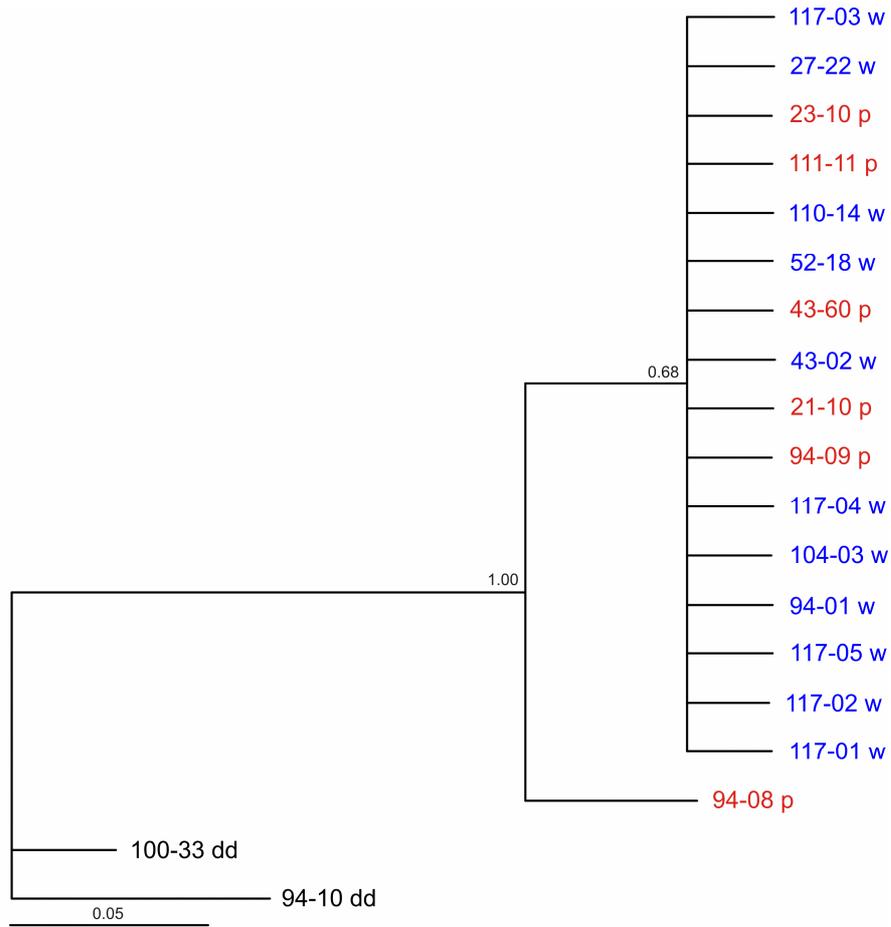
A árvore construída com base em dados de mtDNA (Fig. 18) demonstrou os mesmos clados internos (*P. pygmalion* + *P. wernickei*) pelos dois métodos de estimativa filogenética (valores de suporte >50%). O clado monofilético mais interno, formado por nove terminais, agrupa os espécimes provenientes da região sul do Brasil (Apêndice 1). Entretanto, os demais espécimes, provenientes da região norte do Brasil (Apêndice 1), não formam clados monofiléticos suportados. Os dois indivíduos de *P. dido* agrupam-se externamente em um clado.

Os resultados relativos à análise dos genes nucleares concatenados (Fig. 19) foram congruentes com aqueles obtidos para cada gene em separado. *P. pygmalion* e *P. wernickei*, novamente formando um clado com 100% de suporte. A inferência por MV (Fig. 19b) demonstrou a existência de um cladograma com diversos clados com índices de suporte por *bootstrap* inferiores a 50%; BA (Fig. 19a), por sua vez, não recuperou nenhuma estruturação interna.

Todo o conjunto de dados concatenados (mtDNA + nDNA, Fig. 20) indicou uma topologia geral muito próxima ao de mtDNA. Provavelmente influenciado por essas

Figura 15. Árvores Bayesianas (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base no gene nuclear *wg*. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

a)



b)

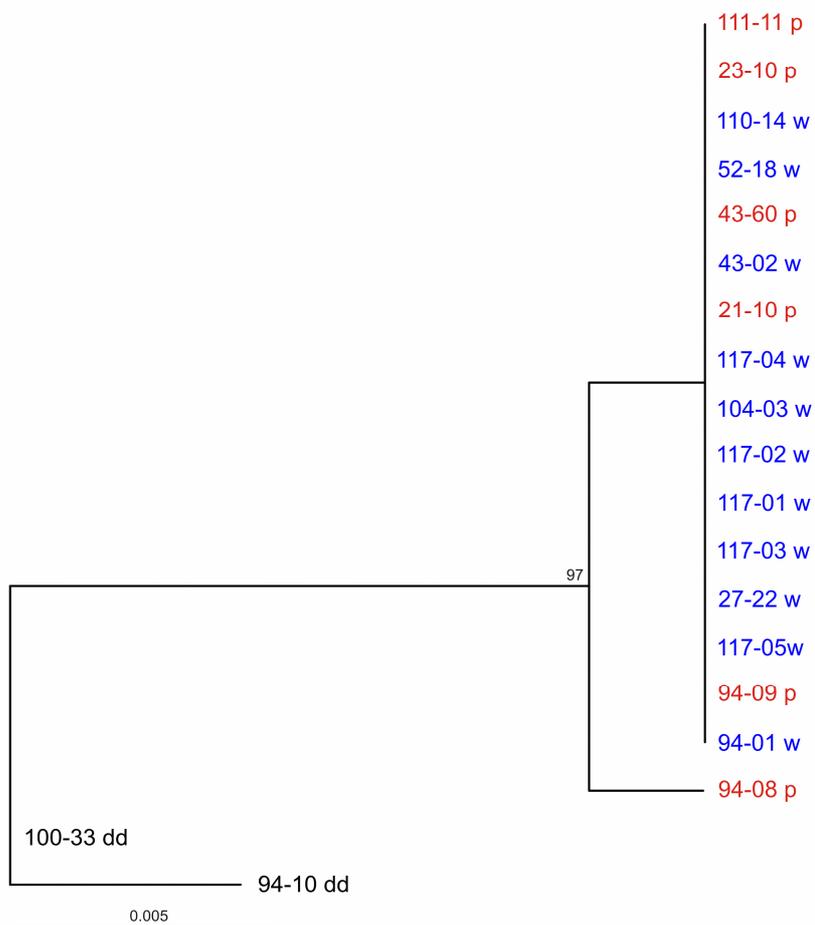
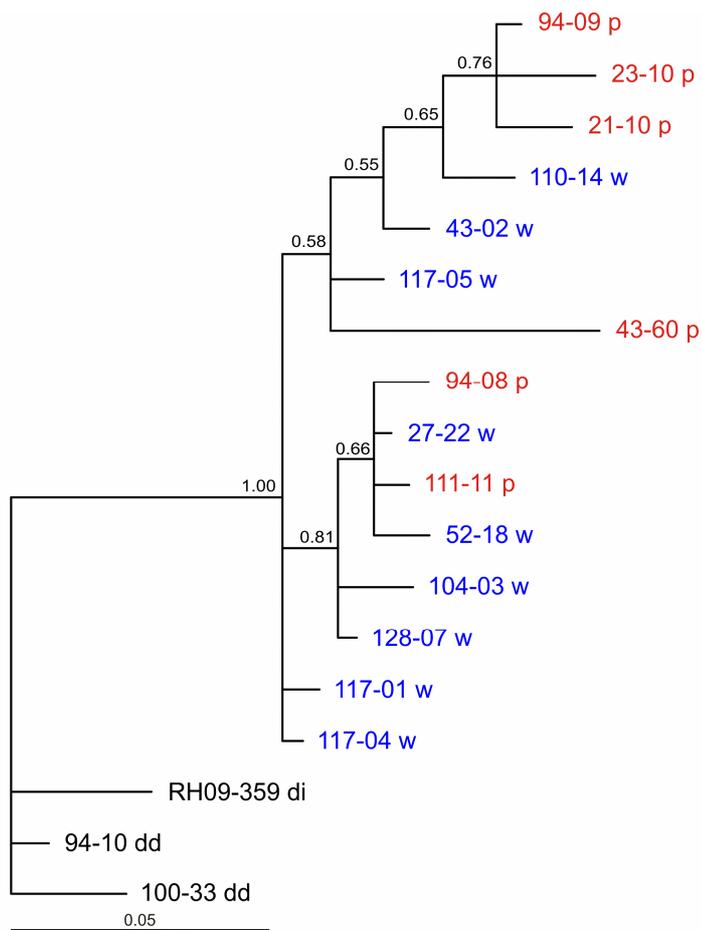


Figura 16. Árvores Bayesiana (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base no gene nuclear *Tpi*. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

a)



b)

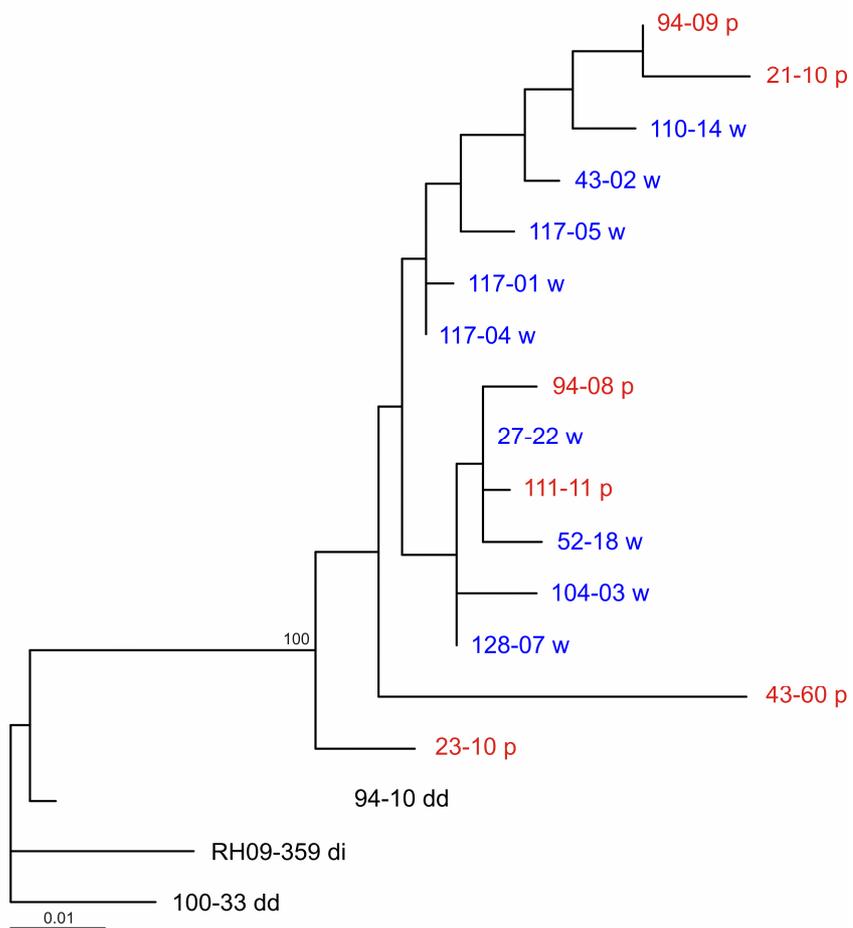


Figura 17. Árvores Bayesiana (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base no gene nuclear *Th*. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

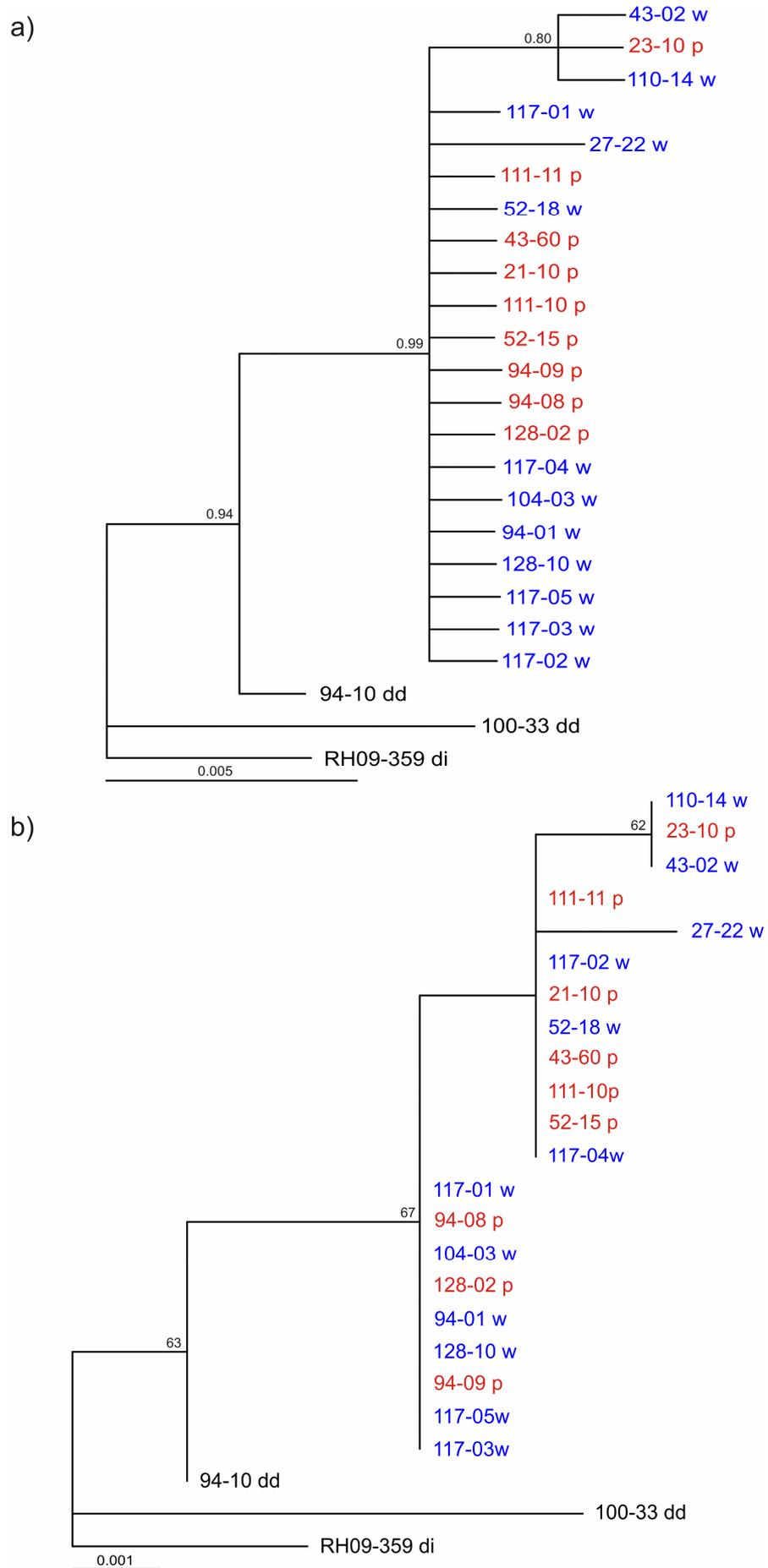
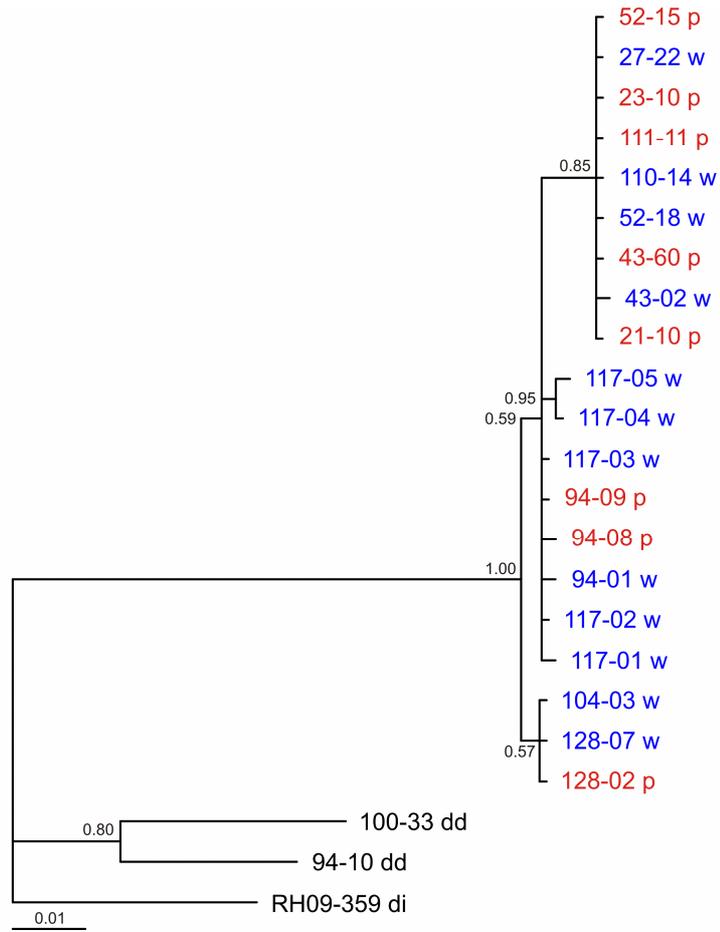


Figura 18. Árvores Bayesiana (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base no gene mitocondrial *COI*. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

a)



b)

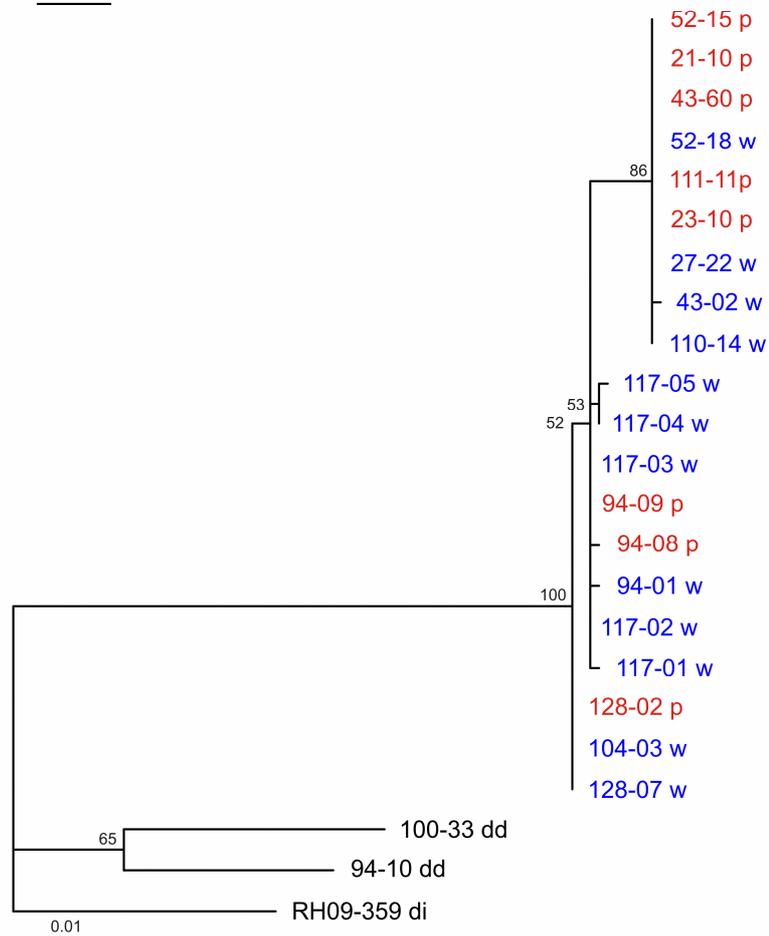


Figura 19. Árvores Bayesiana (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base nos genes nucleares concatenados. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

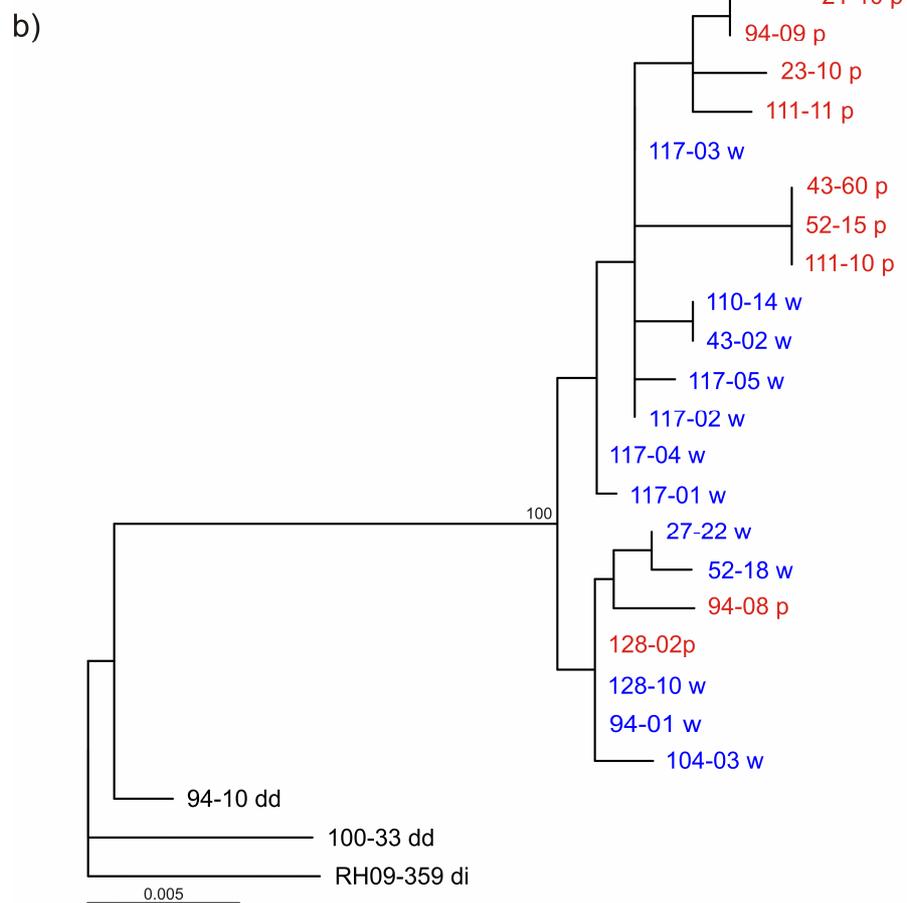
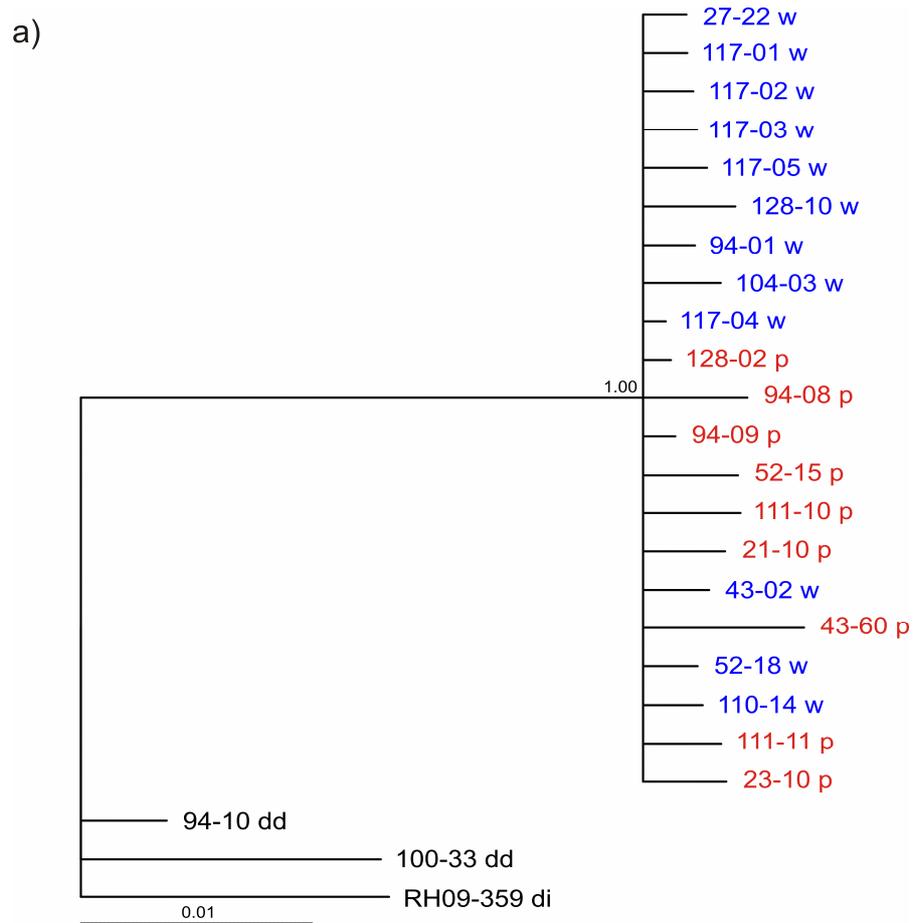
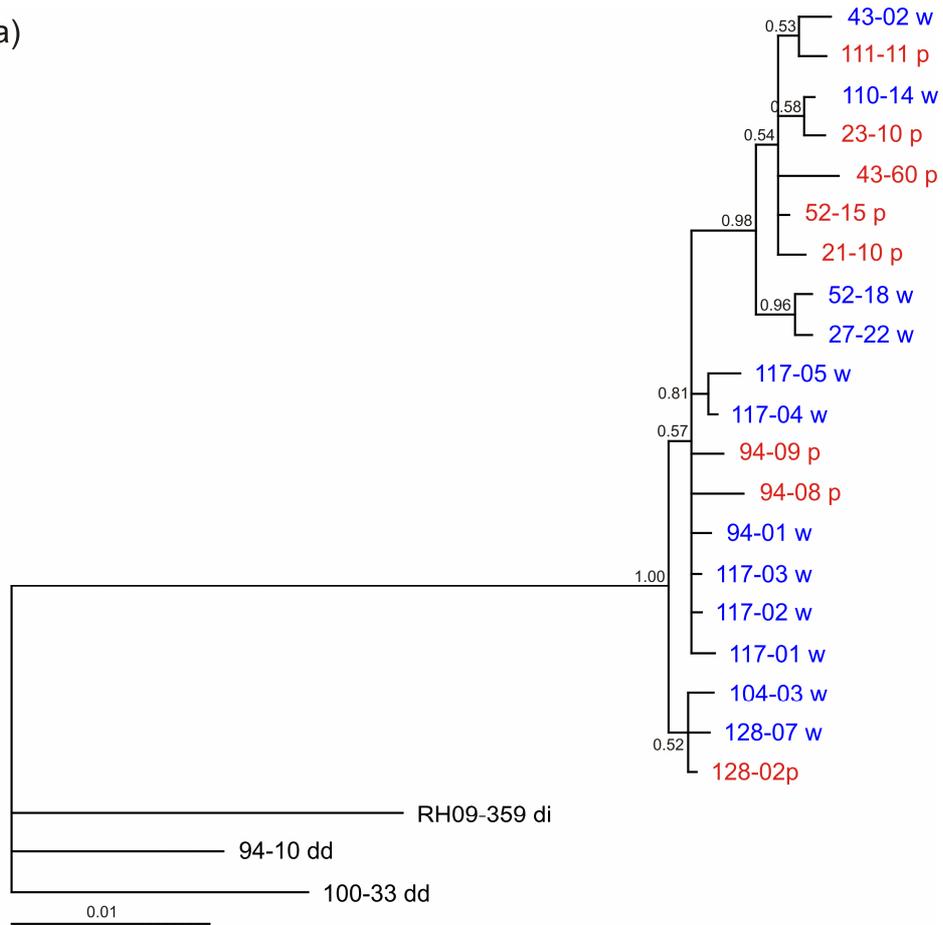
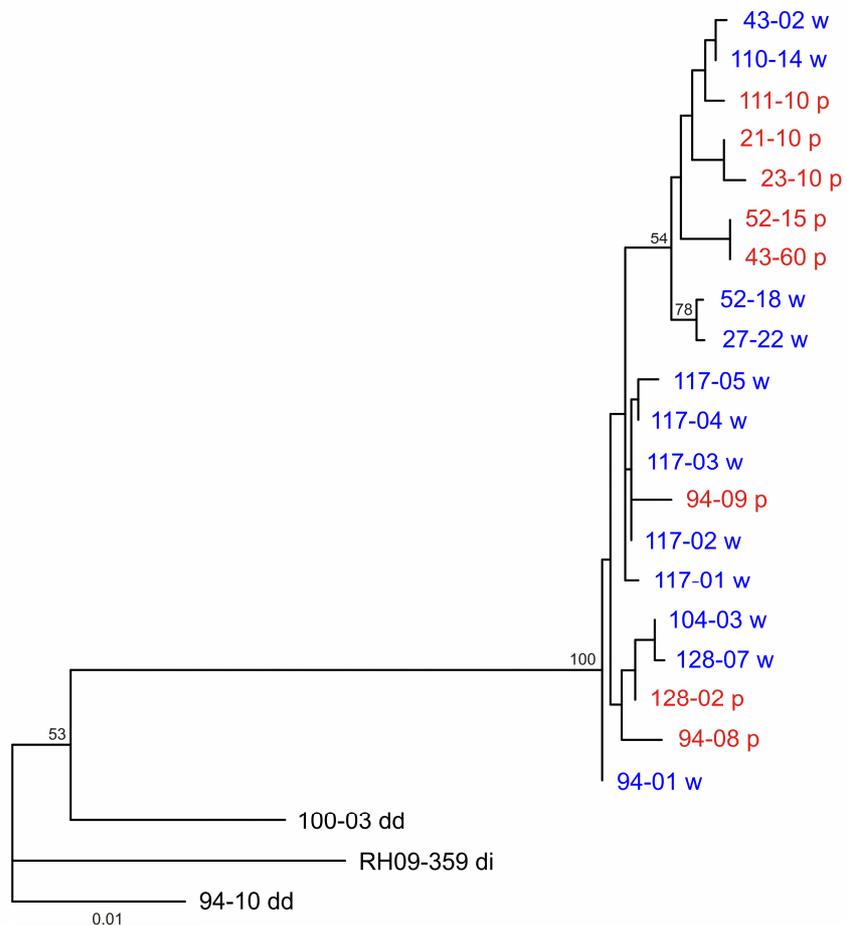


Figura 20. Árvores Bayesiana (a) e de Máxima Verossimilhança (b), com base nos genes nucleares e mitocondriais concatenados. Valores nos ramos indicam índice de probabilidade posterior e valor de suporte por *bootstrap* para cada nó, respectivamente; ramos sem números indicam valores inferiores a 50%. dd, *Philaethria dido*; di, *P. diatonica*; p, *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010); w, *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

a)



b)



seqüências, o mesmo “clado Sul” foi suportado nessa análise. Novamente, não houve monofilia para as espécies do norte.

Excetuando-se o gene CO, nenhuma análise recuperou as relações filogenéticas entre os dois espécimes de *P. dido*. As relações entre *P. dido*, *P. diatonica* e *P. wernickei* também não foram resolvidas.

Análises populacionais em P. wernickei

A divergência pareada das seqüências entre as espécies variou de 0.004 a 0.054 para mtDNA e, de 0.000 a 0.006, para nucleares concatenados (Tab. IV). A variação por F_{ST} (Tab. V) foi de 0.000 a 0.357 e, de -0.001 a 0.456, para mtDNA e nuclear, respectivamente. Os maiores valores de divergência corresponderam à diferença de *P. pygmalion* e *P. wernickei* para as demais espécies, e os menores valores, entre *P. pygmalion* e *P. wernickei*.

Ao comparar as populações dos extremos de distribuição Norte e Sul de *P. wernickei* a divergência genética aumentou, tanto entre espécies quanto dentro de *P. wernickei* (Tabs. VI e VII).

P. wernickei apresentou 8 haplótipos mitocondriais. A maior diversidade haplotípica foi encontrada dentre espécimes do norte, todos com freqüências aproximadas entre si. Já os indivíduos do sul apresentaram dois haplótipos, sendo um (H7) com maior freqüência. A rede de haplótipos (Fig. 21a) indicou que a distância entre os dois grupos é de 7 passos mutacionais. Por outro lado, a distância entre *P. wernickei*, *P. dido* e *P. diatonica* foi superior a 30 mutações.

TABELA IV. Divergência pareada das seqüências entre espécies de *Philaethria*. Abaixo da diagonal, valores de genes nucleares concatenados; acima da diagonal, mtDNA (CO). Asterisco indica que a identificação segue Constantino & Salazar (2010), prévia a este estudo.

Espécie	<i>P. diatonica</i>	<i>P. dido</i>	<i>P. pygmalion</i> *	<i>P. wernickei</i> *
<i>P. diatonica</i>		0.051	0.051	0.051
<i>P. dido</i>	0.006		0.054	0.054
<i>P. pygmalion</i> *	0.005	0.004		0.004
<i>P. wernickei</i> *	0.005	0.004	0.000	

TABELA V. Medida de diferenciação genética, F_{ST} , entre as espécies de *Philaethria*. Abaixo da diagonal, valores de genes nucleares concatenados; acima da diagonal, mtDNA (CO). Asterisco indica que a identificação segue Constantino & Salazar (2010), prévia a este estudo.

Espécie	<i>P. diatonica</i>	<i>P. dido</i>	<i>P. pygmalion</i> *	<i>P. wernickei</i> *
<i>P. diatonica</i>		0.066	0.357	0.075
<i>P. dido</i>	0.295		0.222	0.071
<i>P. pygmalion</i> *	0.456	0.226		0.000
<i>P. wernickei</i> *	0.362	0.163	-0.001	

TABELA VI. Divergência pareada das seqüências entre espécies as espécies de *Phialethria* e grupos de *P. wernickei*. Abaixo da diagonal, valores de genes nucleares concatenados; acima da diagonal, mtDNA (CO).

Espécie	<i>P. diatonica</i>	<i>P. dido</i>	<i>P. wernickei</i> Norte	<i>P. wernickei</i> Sul
<i>P. diatonica</i>		0.041	0.053	0.054
<i>P. dido</i>	0.006		0.055	0.058
<i>P. wernickei</i> Norte	0.008	0.007		0.007
<i>P. wernickei</i> Sul	0.009	0.008	0.001	

TABELA VII. Medida de diferenciação genética, F_{ST} , entre as espécies de *Philaethria* e grupos de *P. wernickei*. Abaixo da diagonal, valores de genes nucleares concatenados; acima da diagonal, mtDNA (CO).

Espécie	<i>P. diatonica</i>	<i>P. dido</i>	<i>P. wernickei</i> Norte	<i>P. wernickei</i> Sul
<i>P. diatonica</i>		0.519	0.968	0.996
<i>P. dido</i>	0.295		0.852	0.859
<i>P. wernickei</i> Norte	0.514	0.284		0.858
<i>P. wernickei</i> Sul	0.396	0.183	0.204	

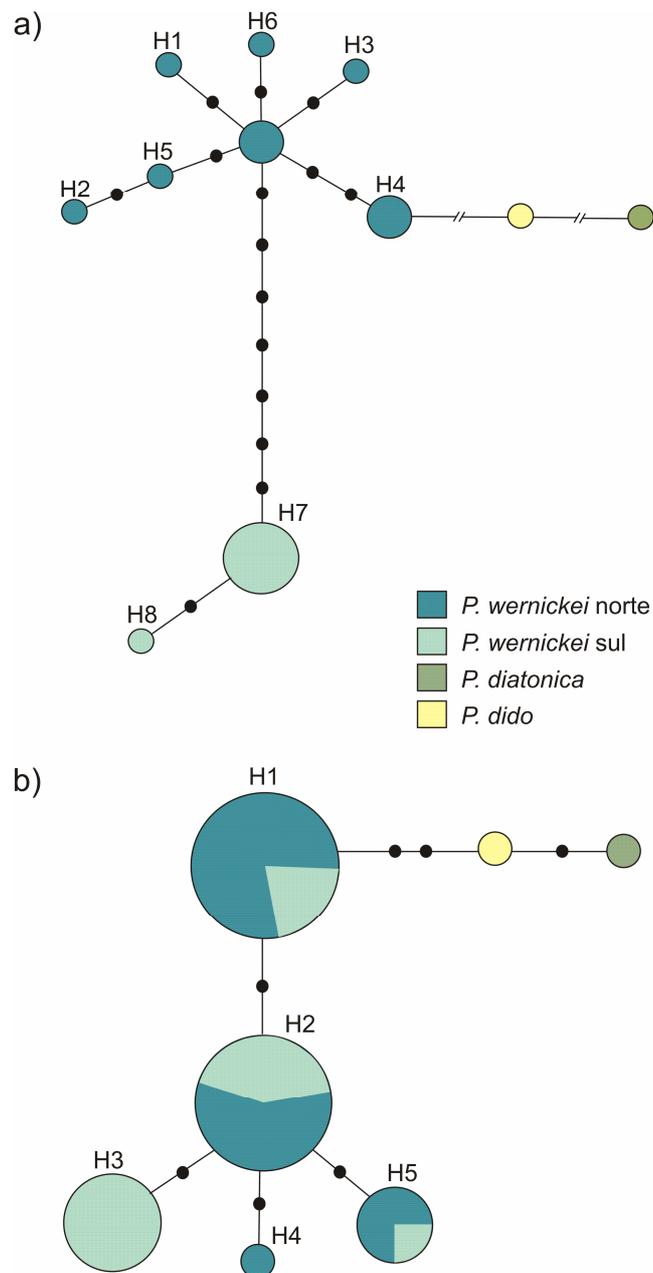


Figura 21. Rede de haplótipos descrevendo as relações entre as populações de *Philaethria wernickei* amostradas no norte e no sul do Brasil. Cada círculo representa um haplótipo e, o tamanho destes, indica a frequência relativa correspondente. O padrão diferencial de coloração indica a fração de observações nas diferentes populações como indicado na legenda interna. Os pequenos círculos pretos indicam as substituições nucleotídicas inferidas naquele ramo.

A rede de haplótipos com as seqüências nucleares concatenadas (Fig. 21b) não demonstrou a existência de separação entre os indivíduos do Norte e do Sul. Somente um alelo é exclusivo do Norte e um do Sul.

3.5 DISCUSSÃO

Philaethria compreende um grupo de espécies taxonomicamente complexo devido a poucas características morfológicas diagnósticas. Propõem-se a sinonímia de *Philaethria wernickei* com *P. pygmalion*, **syn. nov.**, e em conseqüência a expansão da distribuição geográfica desta, sendo desta forma assim tratado doravante neste estudo, uma vez que caracteres morfológicos, morfométricos e genéticos aqui apresentados não suportam a separação destas em duas entidades biológicas distintas. A seguir, discutiremos detalhadamente, os aspectos que corroboram tal iniciativa.

Morfologia da genitália masculina

De uma maneira geral, a genitália masculina de *P. dido* aqui descrita não difere substancialmente daquela contida nas descrições de Brown & Mielke (1972) e Constantino & Salazar (2010). A região basal e em forma de espinho da valva sempre foi encontrada projetando-se dorsal e anteriormente, diferindo do ilustrado por Constantino & Salazar (2010), o que deve ser revisto. Não obstante, as características diferenciais na genitália e asa permitem separar com segurança esta espécie de *P. wernickei*.

Constantino & Salazar (2010) utilizam duas características de genitália para diferenciar *P. pygmalion* e *P. wernickei*; presença e ausência de tufo de cerdas no tegume e a forma da projeção da valva, arredondada e “esvaziada”, em *P. pygmalion* e

P. wernickei, respectivamente. Entretanto, todos os indivíduos avaliados no presente estudo apresentaram estas cerdas e a forma da projeção arredondada da valva e a distribuição dos microespinhos mostraram-se extremamente variáveis, não corroborando os caracteres utilizados por esses autores. Brown & Mielke (1972) também não apontam diferenças entre as valvas para essas espécies. Além disso, estruturas adicionais avaliadas, antes não exploradas nas descrições de genitálias de *Philaethria*, também não mostraram diferenças entre *P. pygmalion* e *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010).

Diversas estruturas da genitália masculina tem sido historicamente negligenciadas em Heliconiini, mesmo tendo potenciais características diagnósticas. Moreira & Mielke (2010), por exemplo, descrevem grande variação no saco e cristas valvares em *Neruda*; grande variedade de formas na fultura inferior e no unco, que também podem ser observadas em Charaxinae (Mielke *et al.* 2004; Dias *et al.* 2010). Além das estruturas usualmente utilizadas nas descrições de *Philaethria*, outras como fultura inferior, gnato e unco, podem conter características diagnósticas. Por exemplo, para diferenciar *P. dido* de *P. wernickei*, pode-se utilizar a fultura inferior, na região posterior, que entra em contato direto com o edeago; o gnato, pela densidade e distribuição da esculpturação, e no unco, pelas microcerdas encontradas no ápice.

Morfometria linear

Para diminuir a subjetividade de conclusões taxonômicas em casos de difícil resolução, a estatística morfométrica é aplicada, principalmente com medidas lineares. Estas mensurações envolvem principalmente variações no tamanho de estruturas em particular e sua análise permite visualizar as variações intra- e inter-específicas (Rohlf 1990; Mutanen & Pretorius 2007). Apesar de sobreposições de caracteres métricos entre

diferentes espécies serem comuns, é esperado que o conjunto de dados permita identificá-las corretamente.

Entretanto, para tais aproximações estatísticas é necessário um grande número amostral, cobrindo boa parte da distribuição geográfica, a fim de se incluir uma variação representativa nas análises. Em *Philaethria*, foram utilizados tradicionalmente para tal, características de coloração das asas, mas com base em poucos exemplares (ex., Salazar 1991; Constantino 1999; Brévignon 2002; Constantino & Salazar 2010), o que não leva em consideração a existência de polimorfismos e/ou plasticidade fenotípica, assim como de praxe na maior parte dos trabalhos alfa-taxonômicos.

A avaliação das características da asa posterior utilizadas para distinguir *P. pygmalion* e *P. wernickei* (senso Constantino & Salazar 2010) falhou em identificar os espécimes, tendo índices de classificação correta reduzidos, corroborando a hipótese suportada pela morfologia da genitália masculina, de que constituem apenas uma entidade biológica. Observando-se a variação das manchas das asas entre indivíduos de *P. wernickei* por classes latitudinais de distribuição geográfica, também não há sustentação para a separação desta em duas espécies, mas sim a existência de uma clina norte/sul, para a largura da banda pós-discal; porém, uma completa sobreposição para EF/DF. Assim, os resultados não corroboram as características utilizadas por Fruhstorfer (1912) e Constantino & Salazar (2010), respectivamente, para diferenciar *P. wernickei* e *P. pygmalion*.

Morfometria geométrica

Devido à sua capacidade de detectar pequenas diferenças na forma, a morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada para a compreensão da evolução

de estruturas biológicas (Klingenberg *et al.* 2001; Monteiro & Nogueira 2009) e de padrões de forma que permitam delimitar espécies (Villemant *et al.* 2007; Valenzuela *et al.* 2009).

As análises por componentes principais e discriminante realizadas neste estudo sustentaram a separação de *P. dido* e *P. wernickei*, corroborando os resultados obtidos pela morfologia da genitália masculina e característica da margem da asa. Entretanto, falharam ao distinguir *P. wernickei* e *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar 2010). O modo usual de identificação destas duas espécies deveria reconhecer as características fenotípicas diferenciais de extremos de distribuição; entretanto, os resultados correspondentes não permitiram sequer diferenciar as populações do Norte e do Sul do Brasil.

Uma variedade de processos biológicos, inclusive adaptações a fatores geográficos locais, produz diferenças na forma entre indivíduos ou espécies (Zelditch *et al.* 2004). Apesar de diferenças intra-específicas sutis no desenvolvimento serem detectadas pela morfometria geométrica como, por exemplo, dessemelhanças intra-específicas em *Drosophila* e *Heliconius erato phyllis*, determinadas pela utilização de plantas hospedeiras distintas (Soto *et al.* 2008a,b; Jorge *et al.* 2011), não há indícios de estruturação ao longo da distribuição geográfica de *P. wernickei* por nenhum dos fatores testados, formando um grupo coeso e inexistindo diferenças significativas inclusive entre os extremos.

Análises filogenéticas

Em sua maioria, os trabalhos filogenéticos em Heliconiini utilizam a totalidade de espécies contidas nos “gêneros basais”, exceto *Philaethria* (Brower & Egan 1997;

Penz 1999; Beltrán *et al.* 2007). Todos sustentam a monofilia do gênero, mas por não utilizarem as mesmas espécies não permitem elucidar as suas relações.

Os genes utilizados, em separado ou concatenados, também não permitem esclarecer as relações filogenéticas entre as três espécies empregadas, *P. diatonica*, *P. dido* e *P. wernickei* (= *P. wernickei* + *P. pygmalion* senso Constantino & Salazar 2010). O gene *Ef1- α* (Beltrán *et al.* 2007) aparentemente separou *P. diatonica* de *P. dido*. Caracteres morfológicos dos estágios imaturos e adulto não estabelecem relações entre as três espécies de *Philaethria* (Penz 1999).

As árvores de genes recuperam um clado monofilético para *P. wernickei* (= *P. wernickei* + *P. pygmalion* senso Constantino & Salazar 2010) sustentado em mais de 95% por probabilidade Bayesiana e *bootstrap*. Além disso, não há evidências de estruturação interna a este clado que apóie a divisão de *P. wernickei* em duas espécies, pois a topologia deste é basicamente uma politomia, remetendo ao padrão comum de filogenias intra-específicas (ex., Wang *et al.* 2008; Wei *et al.* 2010). Há, por outro lado, indícios de estruturação norte-sul evidenciado pelo DNA mitocondrial.

Análises populacionais

Os valores de F_{ST} pareados, a partir dos dados de seqüências, evidenciam isolamento por fluxo gênico entre as espécies *P. dido*, *P. diatonica* e *P. wernickei*. As relações dos haplótipos de DNA mitocondrial de *P. wernickei* indicam um clado fortemente estruturado na região norte e outro na região sul. Por outro lado, os *loci* de DNA nuclear, não reconstituem esta separação geográfica. Diferenças entre os tipos de marcadores podem resultar das características de herdabilidade inerentes a cada um. A estruturação de haplótipos nas regiões norte-sul pode indicar que as fêmeas de *P.*

wernickei apresentam filopatria, ou que se dispersam em menores distâncias que os machos, padrões existentes em outros grupos animais (e.g., Girman *et al.* 2001). Também, pode indicar a retenção de um polimorfismo ancestral suportado por alguma barreira geográfica. Para inferir acerca desta separação norte-sul, são necessários maiores esforços de amostragem em localidades intermediárias, bem como uso de marcadores de co-dominância, como microssatélites e AFLPs.

Considerações adicionais

As variações morfológicas das asas e genitália de *P. wernickei* proporcionam questionamentos sobre as características que fundamentam a descrição e a delimitação de espécies no gênero. Como se acredita que a genitália masculina é extremamente variável e selecionada sexualmente (Hosken & Stockley 2004), torna-se necessário admitir a possibilidade de variações inter-específicas. De fato, leves diferenças entre genitálias são usualmente suficientes para a descrição de novas espécies.

A diversidade intra-específica nos padrões e tons de coloração em asas de Lepidoptera são amplamente documentados, podendo resultar de polifenismos sazonais (Ruszczyk *et al.* 2004; Tiple *et al.* 2009), dimorfismo sexual (Kunte 2008), variação geográfica e mimetismo (Joron *et al.* 1999; Quek *et al.* 2010), entre outros aspectos. Em *Heliconius* e *Eueides* (Heliconiinae: Heliconiini), variações intra-específicas nos padrões de coloração de asas tem sido documentadas e diversas raças geográficas amplamente reconhecidas (Brown 1976; Brower 1994; Holzinger & Holzinger 1994; Hay-Roe 2008). Em contraste, em gêneros como *Dione* e *Philaethria*, considerados basais, toda variação desta ordem parece ser suficiente para a descrição de novas espécies (ex., Constantino & Salazar 2010).

Em *Philaethria*, tem-se utilizado como base para delimitação de novas espécies os resultados obtidos por Suomalainen & Brown (1984) e Brown *et al.* (1992), que determinaram números cromossômicos haplóides para as espécies descritas até então, sugerindo que *P. dido* representa um complexo de espécies devido aos diversos conjuntos cromossômicos diferentes encontrados. A partir dessa hipótese procuraram-se diferenças morfológicas entre os indivíduos de cada número cromossômico haplóide para sustentar novas espécies. Este procedimento está de acordo com a idéia de especiação cromossômica, em que diferentes arranjos cromossômicos representam unidades biológicas distintas, pois os novos rearranjos atuam como barreira reprodutiva pós-zigótica (Lande 1984). Entretanto, algumas espécies animais apresentam-se extremamente conspícuas, mesmo com polimorfismo cromossômico (Fernandes *et al.* 2009) e morfológico (Gonçalves & Freitas 2009). Independentemente, é importante salientar que Suomalainen & Brown (1984) e Brown *et al.* (1992) apontaram o mesmo número cromossômico ($n = 29$) para *P. wernickei* e *P. pygmalion* (senso Constantino & Salazar, 2010), o que, por este critério, não justificaria a separação destas como identidades biológicas distintas.

Os resultados obtidos, embora restritos às espécies de ocorrência no Brasil, demonstra a necessidade de revisão genérica de *Philaethria*, com base em abordagem metodológica integrativa, a fim de delimitar conspícuamente as espécies e permitir a elaboração de hipóteses filogenéticas. Além disso, sugere-se que seja explorado a respeito da origem relativa da pequena diversidade fenotípica de *Philaethria*, quando comparado com gêneros mega diversos da tribo. Questões a serem respondidas neste sentido, relacionam-se a: 1) confirmação ou não de estruturação genética norte/sul encontrada em *P. wernickei* e/ou a existência de fluxo gênico entre essas populações; 2) a situação análoga em *P. dido*, visto que ao contrario do exposto por Constantino &

Salazar (2010), há populações desta espécie também na Floresta Atlântica brasileira; e 3) a determinação do papel do uso diferenciado, ou não, das plantas hospedeiras ao longo desse gradiente latitudinal. Esta última proposição justifica-se, visto que recentemente foi demonstrada a existência de um contínuo na distribuição de algumas espécies de passifloráceas entre a Amazônia e Mata Atlântica (Moreira *et al.*, 2011) e, em adição, que a planta hospedeira utilizada pelos imaturos dos heliconíneos pode influenciar na forma dos adultos correspondentes (Jorge *et al.* 2011).

3.6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.C.; F.J. ROHLF & D.E. SLICE. 2004. Geometric Morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology** **71**: 5-16. doi: 10.1080/11250000409356545.
- ADAMS, D.C. & M.S. ROSENBERG. 1998. Partial warps, phylogeny, and ontogeny: a comment on Fink and Zelditch (1995). **Systematic Biology** **47**: 168-173. doi: 10.1080/106351598261111.
- ADOBE ILLUSTRATOR CORE TEAM. 2008. Adobe Illustrator CS4 v.14.0.0
- ALTHOFF, D.M.; M.A. GITZENDANNER & K.A. SEGRAVES. 2007. The utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. **Systematic Biology** **56**: 477-484. doi: 10.1080/10635150701427077.
- BANDELT, H.J.; P. FORSTER & A. ROHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** **16**: 37-48.
- BARÃO, K.R. & G.R.P. MOREIRA. 2010. External morphology of the immature stages of Neotropical heliconians: VIII. *Philaethria wernickei* (Röber) (Lepidoptera,

- Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Entomologia** **54**: 406-418. doi: 10.1590/S0085-56262010000300008.
- BAYLAC, M. 2008. Rmorph: a morphometric library for R. Available from the author: baylac@mnhn.fr.
- BAYLAC, M. & M. FRIESS. 2005. Fourier descriptors, procrustes superimposition and data dimensionality: an example of cranial shape analysis in modern human populations. In: D.E. Slice (Ed.). **Modern morphometrics in physical anthropology**. New York, Springer-Verlag, 145-162p.
- BAYLAC, M.; C. VILLEMANT & G. SIMBOLOTTI. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. **Biological Journal of the Linnean Society** **80**: 89-98. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00221.x.
- BEEBE, W.; J. CRANE & H. FLEMING. 1960. A comparison of eggs, larvae and pupae in fourteen species of Heliconiine butterflies from Trinidad, W. I. **Zoologica** **45**: 111-154.
- BELTRÁN, M.; C.D. JIGGINS; A.V.Z. BROWER; E. BERMINGHAM & J. MALLETT. 2007. Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. **Biological Journal of the Linnean Society** **92**: 221-239. doi: 10.1111/j.1095-8312.2007.00830.x.
- BOOKSTEIN, F.L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bulletin of Mathematical Biology** **58**: 313-365. doi: 10.1007/BF02458311.
- BRÉVIGNON, C. 2002. Description d'un nouveau *Philaethria* provenant de Guyane Française et notes sur sa biologie. **Lambillionea** **102**: 469- 473.

- BROWER A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **91**: 6491-6495.
- BROWER, A.V.Z. & M.G. EGAN. 1997. Cladistic analysis of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiini): a revised phylogenetic position for *Eueides* based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. **Proceedings of the Royal Society B** **264**: 969-977. doi: 10.1098/rspb.1997.0134.
- BROWN, K.S.Jr. 1976. Geographical patterns of evolution in Neotropical Lepidoptera. Systematics and derivation of known and new Heliconiini. **Journal of Entomology Series B** **44**: 201-242. doi: 10.1111/j.1365-3113.1976.tb00014.x.
- BROWN, K.S.Jr. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology** **26**:427-456. doi: 10.1146/annurev.en.26.010181.002235.
- BROWN, K.S.JR. & W.W. BENSON. 1977. Evolution in modern amazonian non-forest islands: *Heliconius hermathena*. **Biotropica** **9**: 95-117.
- BROWN, K.S.JR. & O.H.H. MIELKE. 1972. The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. **Zoologica** **57**: 1-40.
- BROWN, K.S.JR.; T.C. EMMEL; P.J. ELIAZAR & E. SUOMALAINEN. 1992. Evolutionary patterns in chromosome numbers in neotropical Lepidoptera. **Hereditas** **117**: 109-125. doi: 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00165.x.
- CATERINO, S. & F. A. H. SPERLING. 1999. *Papilio* phylogeny based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and II genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **11**: 122–137.

- CODONCODE CORPORATION. 2010. CodonCode Aligner v. 3.6.1. Disponível em: <http://www.codoncode.com/index.htm> [Acessado em: 09.2010].
- CONSTANTINO, L.M. 1999. Nuevas especies, subespecies y un nuevo genero de Ropaloceros del occidente de Colombia. **Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural 3**: 57-68.
- CONSTANTINO, L.M. & J.A. SALAZAR. 2010. A review of *Philaethria dido* species complex (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) and description of three new sibling species from Colombia and Venezuela. **Zootaxa 2720**: 1-27.
- CORDEIRO-ESTRELA, P.; M. BAYLAC; C. DENYS & J. MARINHO-FILHO. 2006. Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. **Journal of Mammalogy 87**: 1270-1279. doi: 10.1644/05-MAMM-A-293R3.1.
- DASMAHAPATRA, K. K.; M. ELIAS; R.I. HILL; J.I. HOFFMAN & J. MALLET. 2010. Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. **Molecular Ecology Resources 10**: 264-273. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02763.x.
- DELL'ERBA, R.; L.A. KAMINSKI & G.R.P. MOREIRA. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Zoologia 95**: 29-46. doi: 10.1590/S0073-47212005000100006.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology 56**: 879-886. doi: 10.1080/10635150701701083.
- DIAS, F.M.; M.M. CASAGRANDE & O.H.H. MIELKE. 2010. Morfologia do exoesqueleto de adultos de *Memphis moruus stheno* (Pritwittz) (Lepidoptera, Nymphalidae)

- Charaxinae). **Revista Brasileira de Entomologia** **54**: 376-398. doi: 10.1590/S0085-56262010000300006 .
- DRAY, S. & A.B. DUFOUR. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software** **22**: 1-20.
- DRYDEN, I. & K.V. MARDIA. 1998. **Statistical shape analysis**. New York, John Wiley & Sons. XVII+347p.
- EMSLEY, M. 1963. A morphological study of imagine Heliconiinae (Lep.: Nymphalidae) with a consideration of the evolutionary relationships within the group. **Zoologica** **48**: 85-129.
- EXCOFFIER, L.; G. LAVAL & S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin v.3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** **1**: 47-50.
- FALLING RAIN GENOMICS. 2007. Global Gazetteer ver. 2.1, 1996-2006. Disponível em: <http://www.fallingrain.com/world/> [Accessado em: 05.2010].
- FERNANDES, F.A.; R. FORNEL; P. CORDEIRO-ESTRELA & T.R.O. FREITAS. 2009. Intra- and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. **Zoological Journal of the Linnean Society** **155**: 220-237. doi: 10.1111/j.1096-3642.2008.00428.x
- FLEMING, H. 1960. The first instar larvae of the Heliconiinae (Butterflies) of Trinidad, W.I. **Zoologica** **45**: 91-110.
- FRUHSTORFER, H. 1912. Neue Nymphaliden des Neotropischen Gebietes aus der Sammlung Staudinger. **Entomologische Rundschau** **29**: 14-15.

- GIRMAN, D.J.; C. VILÀ; E. GEFFEN; S. CREEL; M.G.L. MILLS; J.W. MCNUTT; J. GINSBERG; P.W. KAT; K.H. MAMIYA & R.K. WAYNE. 2001. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Molecular Ecology** **10**: 1703-1723. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01302.x.
- GLOSK. 2008. Disponível em: <http://www.glosk.com/> [Accessado em: 05.2010].
- GONÇALVES, G.L. & T.R.O. FREITAS. 2009. Intraespecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in southern Brazil. **Journal of Mammalogy** **90**: 1020-1031. doi: 10.1644/07-MAMM-A-314.1.
- HAY-ROE, M.M. 2008. Races of *Heliconius erato* (Nymphalidae: Heliconiinae) found on different sides of the Andes show wing size differences. **Florida Entomologist** **91**: 711-712. doi: 10.1653/0015-4040-91.4.711.
- HEY, J. 2006. Recent advances in assessing gene flow between diverging populations and species. **Current Opinion in Genetics & Development** **16**: 592-596. doi: 10.1016/j.gde.2006.10.005.
- HOLZINGER, H. & R. HOLZINGER. 1994. *Heliconius* and related genera. Venette, Sciences Nat. 328p.
- HOSKEN, D.J. & P. STOCKLEY. 2004. Sexual selection and genital evolution. **Trends in Ecology and Evolution** **19**: 87-93. doi: 10.1016/j.tree.2003.11.012.
- HUDSON, R.R.; M. SLATKIN & W.P. MADDISON. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. **Genetics** **132**: 583-589.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Note** **17**: 754-755. doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.

- JORGE, L.R.; P. CORDEIRO-ESTRELA; L.B. KLACZKO; G.R.P. MOREIRA & A.V.L. FREITAS. 2011. Host-plant dependent wing phenotypic variation in *Heliconius erato*. **Biological Journal of the Linnean Society**.
- JORON, M.; I.R. WYNNE; G. LAMAS & J. MALLET. 1999. Variable selection and the coexistence of multiple mimetic forms of the butterfly *Heliconius numata*. **Evolutionary Ecology** **13**: 721-754.
- KAMINSKI, L.A.; M. TAVARES; V.G. FERRO & G.R.P. MOREIRA. 2002. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Zoologia** **19**: 977-993. doi: 10.1590/S0085-56262002000400016.
- KLINGENBERG, C.P.; A.V. BADYAEV; S.M. SOWRY & N.J. BECKWITH. 2001. Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. **American Naturalist** **157**: 11-23.
- KNOWLES, L.L. & B.C. CARSTENS. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic Biology** **56**: 887-895. doi: 10.1080/10635150701701091.
- KRENN H.W. & C.M. PENZ. 1998. Mouthparts of *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a search for anatomical adaptations to pollen-feeding behavior. **International Journal of Insect Morphology and Embryology** **27**: 301-309. doi: 10.1016/S0020-7322(98)00022-1.
- KRONFORST, M.R.; L.G. YOUNG; L.M. BLUME & L.E. GILBERT. 2006. Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. **Evolution** **60**: 1254-1268. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01203.x.
- KUNTE, K. 2008. Mimetic butterflies support Wallace's model of sexual dimorphism. **Proceedings of the Royal Society B** **275**: 1617-24. doi: 10.1098/rspb.2008.0171.

- LAMAS, G. (Ed.) 2004. Checklist: Part 4A. Hesperioidea - Papilionoidea. In: J. B. Heppner (Ed.). **Atlas of Neotropical Lepidoptera**. Volume 5A. Gainesville, Association for Tropical Lepidoptera, Scientific Publishers. xxxiv+428p.
- LANDE, R. 1984. The expected fixation rate of chromosomal inversions. **Evolution** **38**: 743-752.
- LIBRADO, P. & J. ROZAS. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** **25**: 1451-1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- MALLET, J. 2009. Rapid speciation, hybridization and adaptive radiation in the *Heliconius melpomene* group. In: Butlin, R.K.; J.R. Bridle & D. Schluter (Eds.). **Speciation and patterns of diversity**. Cambridge, Cambridge University Press. 177-194p.
- MIELKE, C.G.; O.H.H. MIELKE & M.M. CASAGRANDE. 2004. Estudo comparado da morfologia externa de *Zaretys itys itylus* (Westwood) e *Agrias claudina annetta* (Gray) (Lepidoptera, Nymphalidae, Charaxinae) III. Abdome. **Revista Brasileira de Zoologia** **21**: 905-912. doi: 10.1590/S0101-81752004000400027.
- MONTEIRO, L.R. & M.R. NOGUEIRA. 2009. Adaptive radiations, ecological specialization, and the evolutionary integration of complex morphological structures. **Evolution** **64**: 724-744. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00857.x.
- MOREIRA, G.R.P. & C.G.C. MIELKE. 2010. A new species of *Neruda* Turner, 1976 from northeast Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiinae, Heliconiini). **Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo** **31**:85-91.

- MOREIRA, G.R.P.; A. FERRARI; C.A. MONDIN & A.C. CERVI. 2011. Panbiogeographical analysis of passion vines at their southern limit of distribution in the Neotropics. **Revista Brasileira de Biociências**.
- MORRONE, J.J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. **Annual Review of Entomology** **51**: 467-494. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130447.
- MUTANEN, M. & E. PRETORIUS. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. **Systematic Entomology** **32**: 371-386. doi: 10.1111/j.1365-3113.2006.00372.x.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PARADIS, E.; K. STRIMMER; J. CLAUDE; G. JOBB; R. OPEN-RHEIN; J. DULTHEIL & N.B. BOLKER. 2006. APE: analyses of phylogenetic and evolution. R package version 1.8-2.
- PENZ, C.M. 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. **Zoological Journal of the Linnean Society** **127**: 277-344. doi: 10.1111/j.1096-3642.1999.tb00680.x.
- PENZ, C. M. & D. PEGGIE. 2003. Phylogenetic relationships among Heliconiinae genera based on morphology (Lepidoptera: Nymphalidae). **Systematic Entomology** **28**: 451-479. doi: 10.1046/j.1365-3113.2003.00221.x.
- POSADA, D. & K.A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** **14**: 817-818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817.

- QUANTUM GIS DEVELOPMENT TEAM. 2010. Quantum GIS Geographic Information System, ver. Tethys 1.5. Open Source Geospatial Foundation Project. Disponível em: <http://qgis.osgeo.org>. [Acessado em: 05.2010].
- QUEK, S-P.; B.A. COUNTERMAN; P.A. MOURA; M.Z. CARDOSO; C.R. MARSHALL; W.O. MCMILLAN & M.R. KRONFORST. 2010. Dissecting comimetic radiations in *Heliconius* reveals divergent histories of convergent butterflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **107**: 7365-7370. doi: 10.1073/pnas.0911572107.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: <http://www.R-project.org> [Acessado em: 07.2009].
- RAE, T.C. 2002. Scaling, polymorphism and cladistic analysis. In: MacLeod, N. & P.L. Forey (Eds.). **Morphology, shape and phylogeny**. London: Taylor & Francis.
- RASBAND, W. 2007. ImageJ 1.43u. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij> [Acessado em: 03.2010].
- RAXWORTHY, C.J.; C.M. INGRAM; N. RABIBISOA & R.G. PEARSON. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. **Systematic Biology** **56**: 907-923. doi: 10.1080/10635150701775111.
- RÖBER, J. 1906. Neue Schmetterling. **Societas Entomologica** **20**: 177-178.
- ROHLF, F.J. 1990. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **21**: 299-316.

- ROHLF, F.J. 2006. TpsDig, version 2.10. Software, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5245. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> [Acessado em: 07.2009].
- ROHLF, F.J. 2008. TpsRelw, version 1.11. Software, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5245. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> [Acessado em: 07.2009]
- ROHLF, F.J. & D.E. SLICE. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology** **39**: 40-59. doi: 10.2307/2992207.
- ROHLF, F.J. & L.F. MARCUS. 1993. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution** **8**: 129-132. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J.
- ROSS, K.G.; D. GOTZEK; M.S. ASCUNCE & D.D. SHOEMAKER. 2010. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology** **59**: 162-184. doi: 10.1093/sysbio/syp089.
- RUSZCZYK, A.; P.C. MOTTA; R.L. BARROS & A.M. ARAÚJO. 2004. Ecological correlates of polyphenism and gregarious roosting in the grass yellow butterfly *Eurema elathea* (Pieridae). **Brazilian Journal of Biology** **64**: 151-164. doi: 10.1590/S1519-69842004000100017.
- SALAZAR, J.A. 1991. Descripción de una nueva especie de *Philaethria* Billberg, 1820 para el occidente de Colombia (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). **SHILAP Revista de Lepidopterologia** **19**: 273-279.
- SEITZ, A. 1913. Heliconiinae, p. 375-402, pls. 72-80, 84-85. In: Seitz, A. (Ed.). 1907-1924. **Die Gross-Schmetterling der Erde** **5**, Stuttgart: Alfred Kernen Verlag. p. 1141.

- SHAEFFER H.B. & R.C. THOMSON. 2007. Delimiting species in recent radiations. **Systematic Biology** **56**: 896-906. doi: 10.1080/10635150701772563.
- SOTO, I.M.; V.P. CARREIRA; E.M. SOTO & E. HASSON. 2008a. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology** **21**: 598-609. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01474.x.
- SOTO, I.M.; E.R. HASSON & M.H. MANFRIN. 2008b. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society** **95**: 655-665. doi: 10.1111/j.1095-8312.2008.00980.x.
- SUOMALAINEN, E. & K.S. BROWN JR. 1984. Chromosome number variation within *Philaethria* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiini). **Chromosoma** **90**: 170-176.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland.
- TIPLE, A.; D. AGASHE; A.M. KHURAD & K. KUNTE. 2009. Population dynamics and seasonal polyphenism of *Chilades pandava* butterfly (Lycaenidae) in central India. **Current Science** **97**: 1774-1779.
- VALENZUELA, I.; V.F. EASTOP; P.M. RIDLAND & A.R. WEEKS. 2009. Molecular and morphometric data indicate a new species of the aphid genus *Rhopalosiphum* (Hemiptera: Aphididae). **Annals of the Entomological Society of America** **102**: 914-924. doi: 10.1603/008.102.0602.
- VENABLES, W.N. & B.D. RIPLEY. 2002. **MASS: modern applied statistics with S**. New York, Springer.

- VILLEMANT, C.; G. SIMBOLOTTI & M. KENIS. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Systematic Entomology** **32**: 625-634. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.00389.x.
- YANG, Z.H. & B. RANNALA. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **107**: 9264-9269. doi: 10.1073/pnas.0913022107.
- YOUNG, A.M. 1974. Further observations on the natural history of *Philaethria dido dido* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). **Journal of the New York Entomological Society** **82**: 30-41.
- WANG, I.J.; A.J. CRAWFORD & E. BERMINGHAM. 2008. Phylogeography of the Pygmy Rain Frog (*Pristimantis ridens*) across the lowland wet forests of isthmian Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **47**: 992-1004. doi: 10.1016/j.ympev.2008.02.021.
- WEI, L.I.; J.R. FLANDERS; S.J. ROSSITER; C.M. MILLER-BUTTERWORTH; L.B. ZHANG & S.Y. ZHANG. 2010. Phylogeography of the Japanese pipistrelle bat, *Pipistrellus abramus*, in China: the impact of ancient and recent events on population genetic structure. **Biological Journal of the Linnean Society** **99**: 582-594. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01387.x.
- WIENS, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology** **56**: 875-8. doi: 10.1080/10635150701748506.
- WIENS, J.J. & M.R. SERVEDIO. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society B** **267**: 631-636. doi: 10.1098/rspb.2000.1049.

ZELDITCH, M.L.; D.L. SWIDERSKI; H.D. SHEETS & W.L. FINK. 2004. **Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer**. New York, Elsevier. 443p.

4. CONCLUSÕES

As diversas abordagens metodológicas utilizadas demonstraram não ser possível distinguir *P. wernickei* de *P. pygmalion*. As características morfológicas comumente utilizadas para tal representam variações intra-específicas e as árvores de genes indicaram um clado monofilético sem evidências de estruturação interna que apóie a divisão de *P. wernickei* em duas espécies ou subespécies, pois a topologia deste é basicamente uma politomia, remetendo ao padrão comum de filogenias intra-específicas. Há, por outro lado, indícios de estruturação norte-sul evidenciado pelo DNA mitocondrial.

Embora restritos às espécies de ocorrência no Brasil, os resultados demonstram a necessidade de revisão genérica de *Philaethria*, com base em abordagem metodológica integrativa, a fim de delimitar coesamente as espécies e permitir a elaboração de hipóteses filogenéticas.

Apêndice 1

Lista de material examinado neste trabalho. Espécimes utilizados em alguma análise em particular estão identificados pelo código abaixo:

† = morfometria geométrica;

* = morfometria linear;

‡ = análises moleculares;

Φ = genitálias dissecadas.

P. dido (Brasil): - **Acre**: Bujari, 18-20.IX.2003, 200 m., O. MIELKE, C. MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 20765[†]); Cruzeiro do Sul, Oberlauf des Rio Juruá, 7-9.III.1979, 200 m., H. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 16382[†], “ex Coleção H. Ebert”); Cruzeiro do Sul, Quellgebiet der Rio Juruá, 13.V.1972, 200 m., S. ZARNN leg., 1 ♂ (DZUP 17228[†], “Coleção H. Ebert”); Iquiri, P. E VANZOLINI leg., 3 ♂♂ (MZUSP[†]); Manoel Urbano, 21.II.2008, ANTONELLI leg., 1 ♀ (DZUP 20800); Porto Walter, 1 ♂ (MZUSP[†]); Santa Rosa do Purus, 6-12.VII.2008, Mielke & Casagrande leg., 1 ♀ (LMCI 65-1^{†Φ}); Senador Guimard, Reserva Catuaba, 31.I-5.II.2009, MIELKE & CASAGRANDE leg., 2 ♂♂ (DZUP 20688[†], 20695[†]), 2 ♀♀ (DZUP 20681, LMCI 66-1^{†Φ}); Seringal Oriente, Rio Juruá, 30.VII.1926, F. C. NOVAES leg., 1 ♂ (DZUP 16564[†], “Coll. D’Almeida”); Uaupés, Rio Negro, 3.V.1951, PADRE FALCO leg., 1 ♂ (DZUP 17165[†], “Coleção H. Ebert”); Xapuri, Seringal Esperança, 6-7.IX.2004, 200 m., O. MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 20772[†]); Xapuri, GUINLE & OITICICA leg., 2 ♂♂ (MNRJ^{†Φ}, “Coleção José Oiticica Filho”); Xapuri, 1 ♂ (MNRJ[†], “Coleção José Oiticica Filho”); 1 ♀ (MNRJ, “Coleção José Oiticica Filho”). - **Alagoas**: Maceió, 16.V.1943, A. CARDOSO leg., 1 ♂ (DZUP 20821[†], “ex Coleção A. Cardoso”). - **Amapá**: Porto Santana,

ICOMI, ROPPA & MIELKE leg., 1 ♀ (MNRJ). - **Amazonas**: Benjamin Constant, Rio Itacoahi, 15.X.1940, PARKO leg., 1 ♂ (MNRJ 4/547^{†Φ}); Benjamin Constant, Rio Javary, II.1942, B. POHL leg., 1 ♂ (MZUSP); Benjamin Constant, Rio Javary, X.1942, B. POHL leg., 1 ♀ (MZUSP); Benjamin Constant, X.1942, PARKO leg., 2 ♂♂ (MNRJ 4/550, 51/990); 1 ♀ (MNRJ 4/549^Φ); Manaus, PARKO leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 4/544); Manaus, GARBE leg., 2 ♂♂ (MZUSP 48384[†], s/nº); Manaus, 1 ♂ (MNRJ 51/991^{†Φ}); Pari Cachoeira, 10.VI.1949, J. C. M. C. leg., 1 ♀ (MNRJ[†]); São Gabriel, Rio Negro, 14.VIII.1927, J. F. ZIKÁN leg., 1 ♂ (MNRJ^{†Φ}); São Gabriel, Rio Negro, 14.XI.1927, J. F. ZIKÁN leg., 1 ♀ (MNRJ); São Gabriel, Rio Negro, 28.XI.1927, J. F. ZIKÁN leg., 1 ♂ (MNRJ); São Paulo de Olivença, 1961, 1 ♂ (DZUP 16679, “Coleção H. Ebert”); São Paulo de Olivença, WAEHNER leg., 1 ♂ (MNRJ 26/270^{†Φ}); São Paulo de Olivença, 2 ♂♂ (MNRJ 4/545^{†Φ}, 26/272); Tefé, 1 ♂ (MZUSP). - **Distrito Federal**: Brasília, Cabeça do Veado, 27.V.1979, GIFFORD leg., 1 ♂ (DZUP 16620^{†Φ}). - **Espírito Santo**: Conceição da Barra, 25.VII.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16665[†]); Conceição da Barra, 2-7.IX.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16742); Conceição da Barra, 11.X.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16693[†]); Conceição da Barra, 25.X.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 16707[†]); Conceição da Barra, 4.VII.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 16721); Conceição da Barra, 4.IX.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 2 ♀♀ (DZUP 16658[†], 16735); Conceição da Barra, 4.X.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16714); Conceição da Barra, 17.XI.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 16644[†]); Linhares, 10.IV.1974, ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16641^{†Φ}); 2 ♀♀ (DZUP 4069, 16592); Linhares, 17.IV.1974, ELIAS leg., 2 ♂♂ (DZUP 17168, 17210[†]); Linhares, 5.V.1974, C. ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 4068); Linhares, 10.V.1974, ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 17182); Linhares, 25.VI.1974, C. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16648[†]); 1 ♀ (DZUP 16634); Linhares, 17.VII.1974, ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16328^{†Φ}); Linhares,

28.VIII.1974, ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16599^{†Φ}). - **Maranhão**: Imperatriz, Açailândia, 26.VIII.1974, MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 16756). - **Mato Grosso**: Barra dos Bugres, Alto Rio Paraguai, 26-29.VII.1974, 150 m., H. & H. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 17249[†], “Coleção H. Ebert”); Diamantino, Fazenda São João, Alto Rio Arinos, 14.I.1978, MIELKE & FURTADO leg., 1 ♂ (DZUP 16585^{†Φ}); Santo Antonio, Rio Madeira, IX.1933, 1 ♂ (DZUP 17154^{†Φ}, “Coll. D’Almeida”). - **Minas Gerais**: Caxambú, 1933, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 ♀ (MNRJ 1117^{†Φ}, “Coleção Dr. A. Costa”); Marliéria, Parque Estadual do Rio Doce, 27.VII.1972, 200 m., H. & H. D. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16613^{†Φ}). - **Pará**: Belém, Utinga, II.1938, A. PINHEIRO leg., 1 ♂ (MPEG); Belém, Utinga, 22.IV.1951, RIFFLE leg., 1 ♀ (MNRJ^{†Φ}); Belém, Utinga, 5.II.1963, ROPPA & MIELKE leg., 1 ♀ (MNRJ^{†Φ}); Belém, Utinga, 12.II.1963, ROPPA & MIELKE leg., 1 ♀ (MNRJ); Belém, Utinga, 19.II.1963, ROPPA & MIELKE leg., 1 ♂ (MNRJ); Belém, Vila de Mosqueiro, “Floresta secundária”, 12.IX.1998, 1 {sem abdome} (MPEG[†]); Belém, Mosqueiro [Vila de Mosqueiro], 22.III.1989, R. VALENTE leg., 1 ♀ (MPEG); Gurupá, X.1978, F. PÔRRES leg., 1 ♂ (MZUSP); Juruti, XII.1971, KESSELRING leg., 1 ♂ (DZUP 16777, “Coleção H. Ebert”); Juruti, III.1972, 1 ♂ (DZUP 17235[†], “Coleção H. Ebert”); Melgaço, Caxiuanã, ECFPn, “Laboratório Estação”, 12-18.VII.1998, 3 {sem abdome} (MPEG); Monte Dourado, V.1977, C. FONSECA leg., 1 ♀ (MPEG); Óbidos, 27.VI.1951, RIFFLER leg., 1 ♀ (MNRJ); Óbidos, 1930, D’ALMEIDA leg., 1 ♂ (DZUP 16543, “Coll. D’Almeida”); Óbidos, 11.IX.1968, A. GENTILI leg., 1 ♀ (DZUP 16728, “ex Col. Gagarin”); Óbidos, XI.1968, J. KESSELRING leg., 1 ♀ (DZUP 17158, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, X.1968, 1 ♂ (DZUP 17263, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, XI.1968, 1 ♂ (DZUP 17214, 17242, “Coleção H. Ebert”); 1 ♀ (DZUP 17256, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, E. MAY leg., 1 ♂ (MNRJ^{†Φ}); 2♀♀ (MNRJ 4/551, 26/273); Óbidos, 1 ♂ (MZUSP, “ex Museu Dirings”); Óbidos, 1 ♂ (MNRJ 26/271^{†Φ}); 1 ♀ (MNRJ 4/548^{†Φ}); 1

{sem abdome} (MNRJ 88/608); Salvaterra, Ilha do Marajó, 1-6.II.2010, K. R. BARÃO leg., 1 ♂ (LMCI 100-33^{†Φ}); Santa Bárbara, 02-03.II.2010, G. R. P. MOREIRA leg., 1 ♂ (LMCI 96-12^Φ); Santarém, 27.I.2010, P. L. SILVA leg., 1 ♀ (LMCI 94-10^{†Φ}); Santo Antônio do Tauá, 21.VI.1997, 1 ♂ (RPPN Klagesi[†]); Santo Antônio do Tauá, 17.VII.1997, 1 ♂ (RPPN Klagesi); Santo Antônio do Tauá, 23.VI.2000, P. JAUFFERT leg., 2 ♂♂ (MPEG, “ex. Coleção P. Jauffert”); Santo Antônio do Tauá, 03.VII.2000, 1 ♂ (RPPN Klagesi); Santo Antônio do Tauá, 12.XI.2000, P. JAUFFERT leg., 1 ♂ (MPEG, “ex. Coleção P. Jauffert”); Santo Antônio do Tauá, 30.VII.2001, P. JAUFFERT leg., 1 ♂ (MPEG, “ex. Coleção P. Jauffert”); Santo Antônio do Tauá, 24.VIII.2001, P. JAUFFERT leg., 1 ♀ (MPEG, “ex. Coleção P. Jauffert”); Santo Antônio do Tauá, Reserva Sonho Azul, 28.IX.2001, P. JAUFFERT leg., 1 ♂ (RPPN Klagesi); Soure, Ilha do Marajó, 17.II.1963, ROPPA & MIELKE leg., 1 ♂ (MNRJ); Soure, Ilha do Marajó, 13-26.II.2009, MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 20814), 1 ♀ (LMCI 67-1^Φ); Vigia, 25.XI.2004, MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 20779). - **Paraná:** Londrina, IV.1938, 1 ♂ (DZUP 17207[†], “Coleção F. Justus Jr”). - **Pernambuco:** Recife, Camaragibe, 7.IX.1958, H. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 16627^{†Φ}); Tiuma [Livramento do Tiuma], 3.VIII.1958, 100 m., H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16333^{†Φ}). - **Rio de Janeiro:** Rio de Janeiro, Botafogo, 1.VIII.1961, 1 ♂ (DZUP 16770^{†Φ}, “ex col. Gagarin”); Corcovado [Rio de Janeiro, Corcovado], 1920, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 1114, “Coleção Adhemar Costa”); Corcovado [Rio de Janeiro, Corcovado], II.1934, D’ALMEIDA leg., 1 ♂ (DZUP 16672[†], “Coll. D’Almeida”); Gávea [Rio de Janeiro, Gávea], 1933, DR. A. COSTA leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 1118[†], “Coleção Dr. Adhemar Costa”); Rio de Janeiro, Jacarepaguá, 21.V.1945, O. C. SILVA leg., 1 ♀ (DZUP 16749, “Coll. D’Almeida”); Rio de Janeiro, Jacarepaguá, 5.VII.1961, D’ALMEIDA leg., 1 ♂ (DZUP 16763[†], “Coll. D’Almeida”); Rio de Janeiro, Sumaré, M.

ROSA leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 57/992[†]). - **Rondônia**: Espigão D'Oeste, 20.IX.1978, GIFFORD leg., 1 ♀ (DZUP 17196^{†Φ}, “ex Coleção Gifford”); Jaru, 4-12.IX.1977, 250 m., GIFFORD & NEGRETT leg., 1 ♂ (DZUP 17259[†], “ex Coleção Gifford”); Ouro Preto d'Oeste, 1-8.IX.1987, C. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16424^{†Φ}, “Projeto PoloNoroeste”); 1 ♀ (DZUP 17224[†], “Projeto PoloNoroeste”); Pimenta Bueno, V-VI.1970, 2 ♂♂ (DZUP 17151[†], 17193); Pimenta Bueno, VII.1970, 1 ♂ (DZUP 17161^{†Φ}); Pimenta Bueno, 8.IX.1970, 2 ♂♂ (DZUP 17231[†], 17238[†]); Pimenta Bueno, 1 ♂ (DZUP 17217[†]); Porto Velho, 15.VII.1978, GIFFORD leg., 1 ♂ (DZUP 17200[†]); Porto Velho, 21.VIII.1979, SHOOKNESS leg., 1 ♂ (DZUP 17266[†]); Vilhena, 10.X.1986, C. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 4067[†], “Polonoroeste”); Vilhena, 11.XII.1986, C. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16557, “Polonoroeste”). - **Roraima**: Alto Alegre, Ilha de Maracá, 24-31.VIII.1987, MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♀ (DZUP 16340[†]); Alto Alegre, Ilha de Maracá, 23-28.II.1988, MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 16347^{†Φ}); 1 ♀ (DZUP 16319).

P. wernickei (Brasil): - **Alagoas**: Chão do Pilar, 7.X.1945, A. CARDOSO leg., 1 ♂ (DZUP 20758^{†*}, “ex coleção A. Cardoso”); Maceió, 22.VIII.1943, A. CARDOSO leg., 1 ♂ (DZUP 20786^{†*}, “ex coleção A. Cardoso”). - **Amazonas**: Manaus [Manaus], IX.1927, E. MAY leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 4991*); Manaus [Manaus], VI.1937, 1 ♀ (DZUP 16384^{†*}); Manicoré, Rio Madeira, E. MAY leg., 1 ♀ (MNRJ 26/268^{†*}); Manaus, 1 {sem abdome} (MNRJ 45/678^{†*}). - **Bahia**: Nova Conquista, 16.III.1963, 850 m., H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16724*); Rio de Contas, Pico das Almas, 27.I.2007, 1450-1600 m., MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♀ (DZUP 20674*). - **Espírito Santo**: Conceição da Barra, 4.VII.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 18712^{†*}); Conceição da Barra, 25.VII.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 3 ♂♂ (DZUP 16740*, 16759*,

16780^{†*Φ}); Conceição da Barra, 27.IX.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 18663^{†*}); Conceição da Barra, 25.X.1968, C. & C. T. ELIAS leg., 1 ♀ (DZUP 16521^{†*}); Conceição da Barra, 5.V.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 2 ♂♂ (DZUP 16754^{†*}, 18677^{†*Φ}); 2 ♀♀ (DZUP 16675^{†*}, 16752*); Conceição da Barra, 12.V.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 2 ♀♀ (DZUP 18675^{†*}, 18696^{†*}); Conceição da Barra, 26.VI.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 3 ♂♂ (DZUP 16747*, 16768^{†*}, 18668^{†*}); Conceição da Barra, 4.VII.1969, C. & C. T. ELIAS leg., 4 ♂♂ (DZUP 16682^{†*}, 16745^{†*Φ}, 18691^{†*}, 18724^{†*}); Jacaraípe, 15.II.1967, H. EBERT leg., 2 ♂♂ (DZUP 16782*, 18705^{†*}); São Mateus, X.1985, ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16719^{†*}). - **Goiás**: Miranorte, IV.1965, L. GOMES leg., 1 {sem abdome} (MPEG*). - **Maranhão**: Nova Feira, Retiro, 18-23.I.2010, O. MIELKE leg., 4 ♂♂ (LMCI 117-1^{*‡Φ}, 117-2^{*‡Φ}, 117-3^{*‡Φ}, 117-4^{*‡Φ}), 1 ♀ (LMCI 117-5^{*‡}). - **Mato Grosso**: Barra do Garças, 19.I.1977, 1 ♀ (DZUP 4073*, “ex Coleção Gifford”); Buriti, Chapada dos Guimarães, 27.VI.1972, 600 m., MIELKE & BROWN leg., 2 ♂♂ (DZUP 4070^{†*}, 16391^{*Φ}); 1 ♀ (DZUP 16412^{†*}); Buriti, Chapada dos Guimarães, 8.VIII.1973, 3 ♂♂ (DZUP 16717^{†*Φ}, 18674*, 18694^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”); Buriti, Chapada dos Guimarães, 8.IV.1979, 700 m., 1 ♀ (DZUP 18695^{†*}, “Coleção H. Ebert”); Chapada dos Guimarães, 30.I.1978, 700 m., 1 ♂ (DZUP 18687^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”); Cuiabá, 19.VII.1979, PEARSON leg., 1 ♂ (MNRJ^{†*Φ}); Nova Xavantina, Bacaba, UNIMAT, 17-19.VIII.1997, MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 16490^{†*}); Utiariti, Rio Papagaio, 1-12.XI.1966, LENKO & PEREIRA leg., 1 ♂ (MZUSP^{†*}); Xavantina, 10.I.1977, GIFFORD leg., 1 ♂ (DZUP 16483^{*Φ}, “ex Coleção Gifford”); 1 {sem abdome} (DZUP 16469^{†*}). - **Minas Gerais**: Caeté, Gongo Soco, 07.VI.2008, G. R. P. MOREIRA leg., 7 ♂♂ (LMCI 43-1*, 43-2^{*‡Φ}, 43-3^{*Φ}, 43-58^{†*}, 43-59*, 43-60^{†‡}, 43-61*); Paracatu, 16.V.1969, 650 m., H. & K. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18681^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”); Paracatu, 16.VI.1972, MIELKE & BROWN leg., 1 ♂

(DZUP 16342^{†*Φ}); Poços de Caldas, Morro São Domingos, III.1961, ROPPA & BECKER leg. (MNRJ^{*Φ}); Poços de Caldas, 10.II.1963, 1250 m., 1 ♂ (DZUP 16696^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”); Catas Altas, Caraça [Serra do Caraçá], 1-5.II.1985, 1300-1500 m., MIELKE & CASAGRANDE leg., 1 ♂ (DZUP 4075^{†*Φ}); 1 ♀ (DZUP 16712^{†*Φ}); Sete Lagoas, IPEACO, 17.I.1959, C. BIEZANKO leg., ♂ (DZUP 18680^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”). - **Paraíba**: João Pessoa, 10.IX.1953, 1 ♂ (DZUP 16356^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”). - **Pará**: Juruti, XII.1971, 1 ♂ (DZUP 16349^{†*}); P. I. Gorotire [São Félix do Xingu, Reserva Florestal de Gorotire], 15.IV.1983, W. L. OVERAL leg., 1 ♀ (MPEG*); Óbidos, 1930, D’ALMEIDA leg., 1 ♂ (DZUP 16405*, “Coll. D’Almeida”); Óbidos, 27.VI.1951, RIFFLER leg., 2 ♂♂ (MNRJ^{†*Φ}); Óbidos, 30.VI.1951, RIFFLER leg., 1 ♂ (MNRJ^{*Φ}); Óbidos, XI.1968, J. KESSELRING leg., 1 ♂ (DZUP 16455*, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, X.1942, 1 ♂ (DZUP 16476*, “Coleção F. Justus Jr”); Óbidos, IX.1959, 1 ♂ (MZUSP*, “ex Museu Dirings”); Óbidos, VIII.1960, 1 ♂ (MZUSP*, “ex Museu Dirings”); Óbidos, V.1967, 1 ♂ (DZUP 16307*, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, XI.1968, 1 ♂ (DZUP 16321*, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, 1967, 1 ♂ (DZUP 16335*, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, 1968, 1 ♂ (DZUP 16398^{†*}, “Coleção H. Ebert”); Óbidos, E. MAY leg., 1 ♀ (MNRJ 26/269^{*Φ}); 1 {sem abdome} (MNRJ 26/266*); Óbidos, E. MAY leg., 1 ♂ (MNRJ*); Óbidos, E. MAY leg., 1 ♀ (MZUSP*); Óbidos, 3 ♂♂ (MNRJ 4/552*, 4/553*, 4/554^{†*Φ}); 1 ♀ (MNRJ 4/555*); Santarém, 11.VII.1978, GIFFORD leg., 3 ♂♂ (DZUP 4071*, 16441*, 16462*, “ex Coleção Gifford”); Santarém, 27.I.2010, P. L. SILVA leg., 6 ♂♂ (LMCI 94-1^{†*‡Φ}, 94-3^Φ, 94-4^{*Φ}, 94-5^{*Φ}, 94-6*, 94-12^{†*}), 5 ♀♀ (LMCI 94-2^Φ, 94-7^Φ, 94-8^{†*‡}, 94-9^{†*‡}, 94-11*); Santarém, 02.III.2010, P. L. SILVA leg., 1 ♂ (LMCI 104-4^{*Φ}), 3 ♀♀ (LMCI 104-1^{†*Φ}, 104-2*, 104-3^{*‡Φ}); Santarém, IV.2010, P. L. SILVA leg., 7 ♂♂ (LMCI 128-1^{†*Φ}, 128-2^{†*‡Φ}, 128-4*, 128-5^{*Φ}, 128-6*, 128-8^{*Φ}, 128-10^{†*‡Φ}), 3 ♀♀ (LMCI 128-3*, 128-7^{†*‡}, 128-9*); Santarém, E. MAY leg., 1 ♀

(MNRJ 4/554*); Santarém, GARBE leg., 2 ♂♂ (MZUSP 48382*, 48383*); 1 ♀ (MZUSP 48381*); São Geraldo do Araguaia, Serra das Andorinhas, 27.VII.2000, I. S. GORAYEB & EQUIPE leg., 3 ♂♂ (MPEG[†]*); Teffé [Tefé], Rio Amazonas, E. MAY leg., 1 ♂ (MNRJ 26/264[†]*). - **Paraná:** Alexandra, Paranaguá, 17.IV.1968, MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 16661[†]*^Φ); Alexandra, Paranágua, 6.IX.1968, MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 16703*); Alexandra, Paranaguá, 3.IV.1971, 10 m., MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 18703*); Curitiba, Cascatinha, 23.IV.1966, O. MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 18684*); Curitiba, 1.IV.1967, O. & E. MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 16710*); Curitiba, UFPR, Centro Politécnico, 15.IV.2008, G. R. P. MOREIRA leg., 3 ♂♂ (LMCI 21-8*, 21-9*, 21-10[†]*[‡]); Curitiba, 17.IV.2008, G. R. P. MOREIRA leg., 4 ♂♂ (LMCI 23-10[†]*[‡]^Φ, 23-11*, 23-12*, 23-13*), 3 ♀♀ (LMCI 23-9*, 23-14*, 23-15*); Curitiba, 31.III.2009, G. R. P. MOREIRA leg., 5 ♂♂ (LMCI 53-1*, 53-2*, 53-4*, 53-5*, 53-6*), 1 ♀ (LMCI 53-3*); Curitiba, UFPR, Centro Politécnico, 31.IV.2009, G. R. P. MOREIRA leg., 9 ♂♂ (LMCI 54-1*, 54-2*, 54-3*, 54-4*, 54-5*, 54-6*, 54-7*, 54-8*, 54-9*); Guaratuba, Castelhanos, 21.IV.1984, 500 m., O. & C. MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 18719*); Morretes, Morro Alto, 4.IV.2009, 300 m., O. MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 20807*); Piraquara, 21.III.1971, C. F. BECKER leg., 1 ♀ (DZUP 4074[†]*^Φ); Pontal do Paraná, Atami, 16-31.XII.2007, 10 m., MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 16497*); Pontal do Paraná, Guaraguatá, 19.IV.2009, MIELKE leg., 1 ♀ (DZUP 20793*); Tijucas do Sul, Vossoroca, 2.III.1981, 850 m., MIELKE leg., 1 {sem abdome} (DZUP 4076*); Tunas do Paraná, 16.IV.2008, G. R. P. MOREIRA leg., 1 ♂ (LMCI 22-16*); Tunas do Paraná, 01.IV.2009, G. R. P. MOREIRA leg., 13 ♂♂ (LMCI 52-1*, 52-2*, 52-3*, 52-6*, 52-9*, 52-10*, 52-11*, 52-13*, 52-14*, 52-15[†]*[‡]^Φ, 52-16*, 52-18[†]*[‡]^Φ, 52-19*), 6 ♀♀ (LMCI 52-4*, 52-5*, 52-7*, 52-8*, 52-12*, 52-17*). - **Rio de Janeiro:** Angra dos Reis, Japuhya [Japuiba], 29.V.1930, TRAVASSOS & ALMEIDA leg., 1 ♀ (DZUP 18717*, “Coll. D’Almeida”); Angra dos Reis, 8.VIII.1969, GENTILI leg., 1 ♀ (

DZUP 4072^{†*}, “Ex Col. Gagarin”); Barra de São João, 4.IX.1975, 10 m., EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18708*, “Coleção H. Ebert”); Gávea [Rio de Janeiro, Gávea], 1918, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 ♀ (MNRJ 1116^{†*}, “Coleção Dr. A. Costa”); Gávea [Rio de Janeiro, Gávea], 1933, DR. ADHEMAR COSTA leg., 2 ♂♂ (MNRJ 1119^{†*Φ}, 1120^{†*Φ}, “Coleção Dr. A. Costa”); Gávea [Rio de Janeiro, Gávea], 31.VIII.1976, E. MAY leg., 1 ♀ (MNRJ 4994*); Gávea [Rio de Janeiro, Gávea], VIII.1976, E. MAY leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 4992*); Itatiaia, 12.II.1959, H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16314^{†*Φ}, “ex. Col. Gagarin”); Itatiaia, 07.III.1925, J. F. ZIKÁN leg., 1 ♀ (MNRJ 16/284*, “Coleção Julius Arp”); Itatiaia, 29.IV.1926, 700 m., J. F. ZIKÁN leg., 1 ♀ (MZUSP*); Itatiaia, 27.IV.1928, 700 m., J. F. ZIKÁN leg., 1 ♂ (MNRJ*); Itatiaia, 29.IV.1930, 700 m., J. F. ZIKÁN leg., 1 ♀ (MNRJ*); Itatiaia, V.1951, 700 m., W. ZIKÁN leg., 2 ♂♂ (MNRJ^{†*Φ}); Itatiaia, 10.IX.1953, J. L. LIMA leg., 1 ♀ (MZUSP*); Imbariê, 21.VII.1963, 25 m., 1 ♀ (DZUP 18701*, “Coleção H. Ebert”); Jacarepaguá, Covanca, Rio de Janeiro, 14.IV.1945, 1 ♂ (DZUP 16528^{†*Φ}, “Coll. D’Almeida”); Macaé, Parque Nacional Reserva de Jurubatiba, IX.2007, J. P. FONTELLA leg., 1 ♀ (MNRJ^{†*}); Nova Iguassú, VI.1921, 1 ♂ (DZUP 16726^{†*Φ}, “Coll. D’Almeida”); Niterói, 14.II.1943, 1 ♂ (MNRJ^{†*Φ}); Paineiras, Rio de Janeiro, XI.1970, E. MAY leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 4993*); Petrópolis, II.1915, MIRANDA leg., 1 ♀ (MZUSP*); Petrópolis, 24.X.1960, GAGARIN leg., 1 ♂ (DZUP 16363^{†*Φ}, “ex. Col. Gagarin”); Petrópolis, 21.II.1964, 1100 m., H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 18722*, “Coleção H. Ebert”); Petrópolis, 13.II.1968, 800-1100 m., H. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18715*, “Coleção H. Ebert”); Petrópolis, 9.IV.1971, 800-1000 m., H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16689*, “Coleção H. Ebert”); Rio [Rio de Janeiro], III.1918, MIRANDA leg., 1 ♀ (MZUSP*); Rio [Rio de Janeiro], FERREIRA D’ALMEIDA leg., 1 ♀ (DZUP 18682*, “Coll. D’Almeida”); Rio [Rio de Janeiro], MARIO ROSA leg., 1 ♂ (MNRJ 5002*); Rio de Janeiro, J. ARP leg., 1 ♀ (MNRJ

16/281*, “Coleção Julius Arp); Santa Tereza, Rio de Janeiro, 23.II.1953, 100 m., H. EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 16668*, “Coleção H. Ebert”); Vista Chinesa, Rio de Janeiro, 19.VI.1947, 1 ♀ (MNRJ*). - **Rio Grande do Norte:** São Jose de Mipibu, 17.VII.1978, O. & C. MIELKE leg., 1 ♂ (DZUP 18698^{†*Φ}). - **Rio Grande do Sul:** Aparados da Serra [Cambará do Sul, Parque Nacional dos Aparados da Serra], 21.IV.1981, T. TESCHE leg., 1 ♀ (MAPA*); Arroio Bonito, 06.V.2000, F. C. QUADROS leg., 1 ♂ (MCTP 9650*); Guarani, 28.XII.1932, BIEZANKO leg., 1 ♂ (DZUP 18666*, “Coleção H. Ebert”); Parecy Novo [Pareci Novo], 1 ♂ (MAPA^{†*Φ}); São Francisco de Paula, 8.I.1997, J. A. TESTON leg., 1 ♂ (MCTP 8501^{†*}); São Francisco de Paula, 11.I.1997, J. A. TESTON leg., 1 ♀ (MCTP 8502*); São Francisco de Paula, G. R. P. MOREIRA leg., 2 ♂♂ (LMCI 27-23*^Φ, 27-24*^Φ), 1 ♀ (LMCI 27-22^{†*‡}); São Francisco de Paula, 15.II.1940, 2 ♂♂ (MAPA^{†*Φ}); São Francisco de Paula, 10.II.1941, 1 ♀ (MAPA*); São Leopoldo, 10.II.1941, 1 ♀ (MAPA^{†*}); Vila Oliva [Caxias do Sul, Vila Oliva], 15.I.1972, 1 ♂ (MAPA^{†*Φ}); Xarqueadas [Charqueadas], XII.1940, 1 ♀ (MAPA^{†*}). - **Rondônia:** Vilhena, 21.VI.1978, GIFFORD leg., 1 ♂ (DZUP 16434^{†*Φ}, “ex Coleção Gifford”); Vilhena, 2.I.1987, C. ELIAS leg., 1 ♂ (DZUP 16448^{†*Φ}, “Polonoroeste”). - **Santa Catarina:** Açailândia, II.1971, 400 m., H. WULLF leg., 1 ♀ (DZUP 18702^{†*}, “Coleção H. Ebert”); Blumenau, 10.V.1970, M. LAUTERJUNG leg., 1 ♀ (DZUP 16775*); Blumenau, HINSTCH leg., 2 ♀♀ (MNRJ 26/264^{†*}, 26/265*^Φ); Blumenau, J. ARP leg., 1 ♂ (MNRJ 16/283^{†*}, “Coleção Julius Arp”); Brusque, IV.1950, H. F. BERLA leg., 1 ♂ (DZUP 16535*, “Coll. D’Almeida”); Brusque, 27.III.1971, C. F. BECKER leg., 2 ♀♀ (DZUP 16542*, 16549^{†*}); Brusque, 10.IV.1971, C. F. BECKER leg., 1 ♀ (DZUP 18710*); Cachoeira, MALLER leg., 1 ♂ (MNRJ 4/558*); Corupa, MALLER leg., 1 {sem abdome} (MNRJ 4/559*); Joinville, 17.I.1971, 200 m., H. & K. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18723*, “Coleção H. Ebert”); Joinville, 25.IV.1971, 100 m., H. EBERT leg., 1 ♂ (DZUP

18716*, “Coleção H. Ebert”); Joinville, 1.XI.1971, 10-200 m., MIERS leg., 3 ♂♂ (DZUP 16761*, 16738*, 16773*); Joinville, I.1941, B. POHL leg., 1 ♀ (MZUSP*); Joinville, V.1941, B. POHL leg., 1 ♂ (MZUSP*); Joinville, 20.III.2010, G. R. P. MOREIRA & O. MIELKE leg., 2 ♂♂ (LMCI 111-10^{†*‡Φ}, 111-11^{†*‡Φ}); Joinville, BRÜCKNER leg., 1 ♂ (MNRJ 4998^{†*Φ}); Joinville, SCHMIDT leg., 2 {sem abdome} (MNRJ 5000*, 5001*); Joinville, 1 ♀ (MNRJ 16/282*, “Coleção Julius Arp”); Rio dos Cedros, Alto do Rio dos Cedros, 22.II.1972, 650 m., LAUTERJUNG leg., 1 ♀ (DZUP 18689*); São Bento do Sul, Rio Vermelho, 16.II.1980, 850 m., RANK leg., 1 ♂ (DZUP 16733*^Φ), 1 ♀ (DZUP 16766^{†*}); São Bento do Sul, Rio Vermelho, 24.II.1980, 850 m., RANK leg., 1 ♀ (DZUP 4077*); São Bento do Sul, II.2010, G. R. P. MOREIRA leg., 13 ♂♂ (LMCI 110-1*^Φ, 110-6*^Φ, 110-8*^Φ, 110-9*^Φ, 110-10*^Φ, 110-11*, 110-12*^Φ, 110-13*^Φ, 110-16*, 110-18*, 110-19*, 110-20*, 110-22*^Φ), 7 ♀♀ (LMCI 110-4*^Φ, 110-5*^Φ, 110-7*^Φ, 110-14^{†*‡}, 110-15*^Φ, 110-17*, 110-21*); São Bento do Sul, 18.XII.1970, 1 ♂ (DZUP 18670*, “Ex Col. Gagarin”); São Bento do Sul, 6.III.1974, 1 ♂ (DZUP 18688*, “Coleção H. Ebert”). - *São Paulo*: Angatuba, XI.1917, AZEVEDO MARQUES leg., 1 ♂ (MNRJ^{†*Φ}); Apiaí, Serra de Paranapiacaba, 22.IV.1972, 900-950 m., EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18667^{†*Φ}, “Coleção H. Ebert”); Caraguatatuba, 5.IX.1963, 10 m., EBERT leg., 1 ♀ (DZUP 18709*, “Coleção H. Ebert”); Mongaguá, 19-24.III.1962, 5 m., EBERT leg., 1 ♂ (DZUP 18673*, “Coleção H. Ebert”); Santo Amaro, 21.IV.1946, C. DUPRAT leg., 1 ♂ (MZUSP*); Santos, 17.XII.1958, A. G. DA SILVA leg., 1 ♀ (MZUSP*); São Bernardo [São Bernardo do Campo], 24.IV.1927, R. SPITZ leg., 1 ♂ (MZUSP 48375*); São Vicente, 13.V.1945, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 ♂ (MNRJ 7807*); Sumaré, VI.1937, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 ♂ (MNRJ 4434^{†*Φ}, “Coleção Dr. A. Costa”); Sumaré, 1.III.1944, DR. ADHEMAR COSTA leg., 1 ♂ (MNRJ*).

Apêndice 2

Tabela A1. Lista de localidades do material analisado neste estudo e respectivas coordenadas geográficas.

Espécie	País	UF	Cidade	Localidade	Latitude	Longitude
<i>P. dido</i>	Brasil	AC	Bujari	-	-9,8400	-67,94
	Brasil	AC	Cruzeiro do Sul	-	-7,6300	-72,6000
	Brasil	AC	Manoel Urbano	-	-8,88	-69,30
	Brasil	AC	Porto Acre	Reserva Humaitá	-9,59	-67,54
	Brasil	AC	Porto Walter	-	-8,26	-72,74
	Brasil	AC	Santa Rosa do Purus	-	-9,4333	-70,4935
	Brasil	AC	Senador Guiomard	Iquiri	-9,8000	-67,2833
	Brasil	AC	Senador Guiomard	Reserva Catuaba	-10,17	-67,83
	Brasil	AC	Seringal Oriente	-	-8,8300	-72,7600
	Brasil	AC	Xapuri	-	-10,6500	-68,5166
	Brasil	AL	Maceió	-	-9,67	-35,72
	Brasil	AM	Benjamin Constant	-	-4,3744	-70,0297
	Brasil	AM	Manaus	-	-3,1133	-60,0252
	Brasil	AM	Pari	-	1,6166	-68,1333
	Brasil	AM	São Gabriel	-	-0,1333	-67,0833
	Brasil	AM	São Paulo de Olivença	-	-3,45000	-68,8000
	Brasil	AM	Tefé	-	-3,3666	-64,7000
	Brasil	AM	Uaupés	-	0,0333	-67,2666
	Brasil	AP	Porto Santana	-	-0,0500	-51,1833
	Brasil	DF	Brasília	-	-15,7800	-47,9200
	Brasil	ES	Conceição da Barra	-	-18,58	-39,75
	Brasil	ES	Linhares	-	-19,4200	-40,0700
	Brasil	MA	Imperatriz	Açailândia	-5,5333	-47,4833
	Brasil	MG	Caxambú	-	-21,9833	-44,9333
	Brasil	MG	Raul Soares	Parque Estadual do Rio Doce	-19,8291	-42,6130
	Brasil	MT	Barra do Bugres	-	-15,0800	-57,1800
	Brasil	MT	Diamantino	Fazenda São João	-14,4200	-56,4500
	Brasil	MT	Santo Antônio	-	-16,53	-56,20
	Brasil	PA	Belém	Mosqueiro	-1,1166	-48,4000
	Brasil	PA	Belém	Utinga	-1,4252	-48,4313
	Brasil	PA	Gurupá	-	-1,4166	-51,6500
	Brasil	PA	Jurutí	-	-2,1666	-56,0666
	Brasil	PA	Melgaço	Reserva Florestal de Caxiuanã	-2,0833	-51,8500
	Brasil	PA	Monte Dourado	-	-0,8666	-52,5166
	Brasil	PA	Óbidos	-	-1,9083	-55,5188
	Brasil	PA	Salvaterra	-	-0,7719	-48,5105
	Brasil	PA	Santa Bárbara	-	-1,2236	-48,2944
	Brasil	PA	Santarém	-	-1,4500	-48,4833
	Brasil	PA	Santo Antonio do Tauá	-	-1,1833	-48,1333

	Brasil	PA	Soure	-	-0,7333	-48,5166
	Brasil	PA	Vigia	-	-0,8000	-48,1333
	Brasil	PE	Livramento do Tiama	-	-7,4700	-35,4000
	Brasil	PE	Recife	Camargibe	-8,0500	-34,9000
	Brasil	PR	Londrina	-	-23,3000	-51,1500
	Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Jacarepaguá	-22,94	-43,36
	Brasil	RJ	Rio de Janeiro	-	-22,90	-43,23
	Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Corcovado	-22,9513	-43,2127
	Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Gávea	-22,9833	-43,2333
	Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Sumaré	-22,9500	-43,2333
	Brasil	RO	Espigão d'Oeste	-	-11,5800	-60,9800
	Brasil	RO	Jaru	-	-10,4300	-62,4500
	Brasil	RO	Ouro Preto do Oeste	-	-10,6700	-62,3000
	Brasil	RO	Pimenta Bueno	-	-11,6500	-61,2000
	Brasil	RO	Porto Velho	-	-9,6000	-64,8800
	Brasil	RO	Vilhena	-	-12,7200	-60,1200
	Brasil	RR	Alto Alegre	Ilha de Maracá	-2,8980	-61,4913
<i>P. wernickei</i>	Brasil	AL	Pilar	-	-9,60	-35,93
	Brasil	AM	Manaus	-	-3,1133	-60,0252
	Brasil	AM	Manicoré	-	-5,8122	-61,2975
	Brasil	AM	Tefé	-	-3,3666	-64,7000
	Brasil	BA	Nova Conquista	-	-15,50	-41,25
	Brasil	BA	Rio de Contas	Pico das Almas	-13,5500	-41,9333
	Brasil	ES	Conceição da Barra	-	-18,58	-39,75
	Brasil	ES	Jacaraípe	-	-20,15	-40,18
	Brasil	ES	São Mateus	-	-18,73	-39,85
	Brasil	GO	Miranorte	-	-9,4766	-48,4802
	Brasil	MA	Nova Feira	Retiro	-3,43	-42,90
	Brasil	MG	Caeté	Gongo Soco	-21,81	-43,26
	Brasil	MG	Paracatu	-	-17,2200	-46,8700
	Brasil	MG	Poços de Caldas	-	-21,80	-46,57
	Brasil	MG	Catas Altas	Serra do Caraçá	-20,1333	-43,5000
	Brasil	MG	Sete Lagoas	-	-19,45	-44,23
	Brasil	MT	Barra do Garças	-	-15,88	-52,25
	Brasil	MT	Buriti	Chapada dos Guimarães	-17,2833	-46,4666
	Brasil	MT	Cuiabá	-	-15,5833	-56,0833
	Brasil	MT	Nova Xavantina	Bacaba	-14,6666	-52,3458
	Brasil	MT	Utiariti	-	-13,0333	-58,2833
	Brasil	MT	Xavantina	-	-14,6700	-52,3500
	Brasil	PA	Juruti	-	-2,1666	-56,0666
	Brasil	PA	Óbidos	-	-1,9083	-55,5188
	Brasil	PA	Santarém	-	-1,4500	-48,4833
	Brasil	PA	São Félix do Xingu	Reserva Florestal de Gorotire	-7,5000	-52,0000
	Brasil	PA	São Geraldo do Araguaia	Serra das Andorinhas	-6,4000	-48,5333
	Brasil	PB	João Pessoa	-	-7,1200	-34,8700
	Brasil	PR	Alexandra	-	-25,5666	-48,6166

Brasil	PR	Curitiba	-	-25,4166	-49,2500
Brasil	PR	Guaratuba	-	-25,90	-48,57
Brasil	PR	Morretes	Morro Alto	-25,47	-48,82
Brasil	PR	Piraquara	-	-25,4333	-49,0666
Brasil	PR	Pontal do Paraná	-	-25,5800	-48,3500
Brasil	PR	Tijucas do Sul	Vossoroca	-25,9269	-49,1788
Brasil	PR	Tunas do Paraná	Parque Estadual de Campinhos	-24,97	-49,10
Brasil	RJ	Angra dos Reis	-	-23,0000	-44,3000
Brasil	RJ	Barra de São João	-	-22,6000	-42,0000
Brasil	RJ	Imbariê	-	-22,63	-43,20
Brasil	RJ	Itatiaia	-	-22,5000	-44,5666
Brasil	RJ	Rio de Najeiro	Jacarepaguá	-22,9427	-43,3580
Brasil	RJ	Macaé	-	-22,3833	-41,7833
Brasil	RJ	Niterói	-	-22,8844	-43,0944
Brasil	RJ	Nova Iguassú	-	-22,7572	-43,4488
Brasil	RJ	Paineiras	-	-22,0500	-41,4833
Brasil	RJ	Petrópolis	-	-22,5108	-43,1844
Brasil	RJ	Rio de Janeiro	-	-22,9000	-43,2333
Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Gávea	-22,9833	-43,2333
Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Santa Teresa	-22,1666	-43,5852
Brasil	RJ	São João da Barra	Parque Estadual de Iquipari	-21,63	-41,05
Brasil	RJ	Rio de Janeiro	Vista Chinesa	-22,9695	-43,4321
Brasil	RN	São José do Mipibu	-	-6,0833	-35,2500
Brasil	RO	Vilhena	-	-12,7200	-60,1200
Brasil	RS	Arroio Bonito	-	-29,3700	-53,0500
Brasil	RS	Cambará do Sul	Aparados da Serra	-28,7000	-50,4000
Brasil	RS	Caxias do Sul	Vila Oliva	-29,2333	-50,8833
Brasil	RS	Charqueadas	-	-29,97	-51,63
Brasil	RS	Guarani	-	-28,1333	-54,5666
Brasil	RS	Maquiné	-	-29,6833	-50,1833
Brasil	RS	Pareci Novo	-	-29,65	-51,40
Brasil	RS	São Francisco de Paula	-	-29,4500	-50,5800
Brasil	RS	São Francisco de Paula	FLONA São Francisco de Paula	-29,4236	-50,3871
Brasil	RS	São Leopoldo	-	-29,77	-51,15
Brasil	SC	Blumenau	-	-26,9333	-49,0500
Brasil	SC	Brusque	-	-27,1000	-48,9333
Brasil	SC	Cachoeira	-	-27,4333	-48,4500
Brasil	SC	Corupá	-	-26,4333	-49,2333
Brasil	SC	Itajaí	-	-26,88	-48,65
Brasil	SC	Joinville	-	-26,3000	-48,8333
Brasil	SC	Rio dos Cedros	Alto do Rio dos Cedros	-26,7333	-49,2666
Brasil	SC	São Bento do Sul	-	-26,2497	-49,3825
Brasil	SP	Angatuba	-	-23,4833	-48,4166
Brasil	SP	Apiá	-	-24,52	-48,83
Brasil	SP	Caraguatatuba	-	-23,6166	-45,4166
Brasil	SP	Mongaguá	-	-24,1000	-46,6166

Brasil	SP	Santo Amaro	-	-23,6500	-46,7000
Brasil	SP	Santos	-	-23,9500	-46,3333
Brasil	SP	São Bernardo do Campo	-	-23,700	-46,5500
Brasil	SP	São Vicente	-	-23,9629	-46,3918
Brasil	SP	Sumaré	-	-22,8000	-47,2833

UF, Unidade Federativa; AC, Acre; AL, Alagoas; AM, Amazonas; AP, Amapá; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; MA, Maranhão; MG, Minas Gerais; MT, Mato Grosso; PA, Pará; PB, Paraíba; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; RO, Rondônia; RR, Roraima; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo.

ANEXO

Zoologia: Instruções aos autores¹

Scope and policies

Scope. **ZOOLOGIA**, the scientific journal of the Sociedade Brasileira de Zoologia (SBZ), publishes original articles on Zoology authored by both members and non-members of the Society. Manuscripts should have a scientific character. *A priori*, the following types of articles are not acceptable for publication: simple occurrence notes, new records (*e.g.* geographical, host), notes on distribution, case studies, species lists, or merely descriptive studies, unless very well qualified by the authors. Justifications should be sent to the Editor-in-Chief before submission. Short communications are acceptable, whereas review articles will be considered by direct invitation. Manuscripts will be analyzed by at least two *ad hoc* reviewers, and the decision to accept or reject the manuscript will be based on the recommendations by the section editors and the *ad hoc* reviewers.

Responsibility. For a manuscript to be submitted to **ZOOLOGY**, it is required that: 1) all authors approved the submission; 2) the results or opinions therein are original; 3) the manuscript has not been published before, is not currently under review by other journal, and will not be submitted elsewhere unless it was rejected by **ZOOLOGIA** or removed from the reviewing process by written notification to the Editor-in-Chief; 4) it was prepared according to the Instructions to Authors; 5) if accepted for publication and published, the article or part of it will not be published elsewhere unless there is written permission by the Editor-in-chief; 6) the reproduction and use of articles published in **ZOOLOGIA** is allowed for demonstrated educational and non-commercial purposes. All remaining uses require agreement and fees will be applied when appropriate; 7) the publication and page charges and review fees are agreed upon by the authors; 8) the authors are entirely responsible for the scientific and grammatical content of the article; 9) the authors agree with additional fees whenever a revision of the English grammar is deemed necessary.

Language. The manuscript should be written exclusively in English. To avoid delays in publication, we suggest that, before it is submitted, the manuscript should be reviewed by a specialist in the field who is a native speaker. After recommendation for

¹ Acessado em 20.12.2010

publication, the manuscript will be reviewed and a final revision of the language might be requested.

Sections. Systematics and evolution, Taxonomy and nomenclature, Biogeography, Morphology and physiology, Biology, Ecology, Symbiosis, Conservation, Behavior, Genetics, Applied Zoology, Aquaculture and fisheries.

Fees. Members of the SBZ are exempt from page charges, whereas publication costs are charged in the case of non-members, as indicated in the price list published in the society's website (www.sbzoologia.org.br).

Submission. Only online submissions will be accepted, through the following address: <http://submission.scielo.br/index.php/rbzool/index>. Using this submission system, one can submit the manuscript and monitor its status during the editorial process, ensuring speed and privacy in the manuscript submission and accelerating the review process. If difficulties are encountered in the use of the system, there are several tutorials in the website of the Sociedade Brasileira de Zoologia which could be of assistance. The manuscript should be prepared according to the Instructions to Authors.

When submitting a manuscript to the journal, the authors should acknowledge that, if accepted for publication, the copyright of the article, including the rights to reproduction in all media and formats, will be provided exclusively to the Sociedade Brasileira de Zoologia. The journal will not deny legitimate request by the authors to reproduce their work.

For more information on the format and style of the journal, please check a recent issue of the journal or its website at www.sbzoologia.org.br. Additional information can be obtained from the editors or through the email sbz@sbzoologia.org.br.

Form and preparation of manuscripts

GENERAL ORIENTATIONS

ZOOLOGIA, the journal of the Sociedade Brasileira de Zoologia (SBZool), publishes original scientific articles on Zoology, authored by members and non-members of the Society. Members of the SBZ publish free of charge, whereas non-members are required to pay page charges, as indicated in the updated price list published in the Society's homepage (<http://www.sbzoologia.org.br>).

Manuscripts should be prepared solely in English. Manuscript submission to **ZOOLOGIA** is available online only at the address

<http://submission.scielo.br/index.php/rbzool/index>. The system is user-friendly and allows authors to monitor the submission process. If you have any difficulty with the system, there are many tutorials at the SBZool site that can help you. All documents should be prepared with a word-processor software (preferably MS WORD or compatible).

ZOOLOGIA refrains from publishing simple occurrence notes, new records (e.g. geographic, host), distribution notes, case studies, list of species, and similar purely descriptive studies, unless well justified by the authors. Justification should be sent prior submission to the Managing Editor.

RESPONSIBILITY

Manuscripts are received by **ZOOLOGIA** with the understanding that:

- all authors have approved submission;
- the results or ideas contained therein are original;
- the paper is not under consideration for publication elsewhere and will not be submitted elsewhere unless rejected by **ZOOLOGIA** or withdrawn by written notification to the Managing Editor;
- the manuscript has been prepared according to these instructions to authors;
- if accepted for publication and published, the article, or portions thereof, will not be published elsewhere unless consent is obtained in writing from the Managing Editor;
- reproduction and fair use of articles in **ZOOLOGIA** are permitted provided the intended use is for nonprofit educational purposes. All other use requires consent and fees where appropriate;
- the obligation for page charges and text revision fees is accepted by the authors.
- the authors are fully responsible for the scientific content and grammar of the article.
- the authors agree with additional fees associated with English revisions, if necessary.

FORMS OF PUBLICATION

Articles: original articles on all areas of the Zoology.

Short Communications: this form of publication represents succinct, definitive information (as opposed to preliminary results) that does not lend itself to inclusion in a typical, more comprehensive article. A new or modified technique may be presented as a research note only if the technique is not to be used in ongoing studies. Ordinarily, techniques are incorporated into the materials and methods section of a regular article.

Review articles: only invited reviews are published. Unsolicited reviews should not be submitted, but topics may be suggested to the editor or members of the editorial board.

Opinion: letters to the editor, comments on other publications and ideas, overviews and other texts that are characterized as the opinion of one or a group of scientists.

Book reviews: books having a broad interest to the membership of the Society are reviewed by invitation.

Short biography: biography of important zoologists that significantly contributed with the knowledge on animal sciences.

MANUSCRIPTS

The text must be left-justified and the pages and lines should be numbered. Use the Times New Roman font, 12 points. The front page must include: 1) the title of the article including the name(s) of the higher taxonomic category(ies) of the animals treated; 2) the name(s) of the author(s) with their professional affiliation, only for correspondence purposes, additional affiliations should be included in the Acknowledgments section; 3) name of the Corresponding Author with complete addresses for correspondence, including e-mail; 4) an abstract in English; 5) up to five key words in English, in alphabetical order and different of those words used in the title. The total information on the items 1 to 5 cannot exceed 3,500 characters including the spaces, except if authorized by the Managing Editor.

Literature citations should be typed in small capitals, as follows: Smith (1990), (Smith 1990), Smith (1990: 128), Smith (1990, 1995), Lent & Jurberg (1965), Guimarães *et al.* (1983). Articles by the same author or sequences of citations should be in chronological order.

Only the names of genera and species should be typed in italics. The first citation of an animal or plant taxon in the text must be accompanied by its author's name in full, the date (of plants, if possible) and the family, following the pattern established by the International Code of Zoological Nomenclature.

The manuscript of scientific articles should be organized as indicated below. Other major sections and subdivisions are possible but the Managing Editor and the Editorial Committee should accept the proposed subdivision.

Articles and Invited Review

Title. Avoid verbiage such as "preliminary studies on...", "aspects of ...", and "biology or ecology of...". Do not use author and date citations with scientific names in the title. When taxon names are mentioned in the title, it should be followed by the indication of higher categories in parenthesis.

Abstract. The abstract should be factual (as opposed to indicative) and should outline the objective, methods used, conclusions, and significance of the study. Text of the abstract should not be subdivided nor should it contain literature citations (exceptions are analyzed by the editors). It should contain a single paragraph.

Key words. Up to five key words in English, in alphabetical order and different of those words used in the title, separated by semicolon. Avoid using composite key words.

Introduction. The introduction should establish the context of the paper by stating the general field of interest, presenting findings of others that will be challenged or expanded, and specifying the specific question to be addressed. Accounts of previous work should be limited to the minimum information necessary to give an appropriate perspective. The introduction should not be subdivided.

Material and Methods. This section should be short and concise. It should give sufficient information to permit repetition of the study by others. Previously published or standard techniques must be referenced, but not detailed. If the material and methods section is short, it should not be subdivided. Avoid extensive division into paragraphs.

Results. This section should contain a concise account of the new information. Tables and figures are to be used as appropriate, but information presented in them should not be repeated in the text. Avoid detailing methods and interpreting results in this section.

Taxonomic papers have a distinct style that must be adhered to in preparing a manuscript. In taxonomic papers the results section is to be replaced by a section headed TAXONOMY, beginning at the left-hand margin. The description or redescription of species is accompanied by a taxonomic summary section. The **taxonomic summary** section comprises a listing of site, locality and specimens deposited (with respective collection numbers). The appropriate citation sequence and format include: Country, *Province or State*: City or County (minor area as locality, neighborhood, and others, lat

long, altitude, all in parenthesis), number of specimens, sex, collection date, collector followed by the word *leg.*, collection number. This is a general guideline that should be adapted to different situations and groups. Several examples can be found in the previous numbers of the **ZOOLOGIA**. The taxonomic summary is followed by a remarks section (**Remarks**). The Remarks section replaces the discussion of other articles and gives comparisons to similar taxa. Museum accession numbers for appropriate type material (new taxa) and for voucher specimens (surveys) are required. Type specimens, especially holotypes (syntypes, cotypes), should not be maintained in a private collection. Appropriate photographic material should be deposited if necessary. Frozen tissues must also include accession numbers if deposited in a museum.

Discussion. An interpretation and explanation of the relationship of the results to existing knowledge should appear in the discussion section. Emphasis should be placed on the important new findings, and new hypotheses should be identified clearly. Conclusions must be supported by fact or data. Subdivisions are possible. A section labeled Conclusion is not allowed in **ZOOLOGIA**.

Acknowledgments. These should be concise. Ethics require that colleagues be consulted before being acknowledged for their assistance in the study.

Literature Cited. Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section and all items in this section must be cited in the text. Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a city, publisher, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as "in press" only exceptionally and until the copyediting stage when the reference should be completed or suppressed if not published by then. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by "pers. comm.", providing the person cited is aware of the manuscript and the reference to his person therein. Personal communications do not appear in the Literature Cited section. The references cited in the text should be listed at the end of the manuscript, according to the examples below. The title of each periodical must be complete, without abbreviations.

Periodicals

Always add DOI whenever available (as shown below).

GUEDES, D.; R.J. YOUNG & K.B. STRIER. 2008. Energetic costs of reproduction in female northern miquis, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Platyrrhini: Atelidae).

Revista Brasileira de Zoologia 25 (4): 587-593. doi: 10.1590/S0101-81752008000400002.

LENT, H. & J. JURBERG. 1980. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia** 40 (3): 611-627.

SMITH, D.R. 1990. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera, Symphita) of America South of the United States: Pergidae. **Revista Brasileira de Entomologia** 34 (1): 7-200.

Books

HENNING, W. 1981. **Insect phylogeny**. Chichester, John Wiley, XX+514p.

Chapter of book

HULL, D.L. 1974. Darwinism and historiography, p. 388-402. In: T.F. GLICK (Ed.). **The comparative reception of Darwinism**. Austin, University of Texas, IV+505p.

Electronic resources

MARINONI, L. 1997. Sciomyzidae. In: A. SOLIS (Ed.). **Las Familias de insectos de Costa Rica**. Available online at: <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/texto630.html> [Accessed: date of access].

Illustrations. Photographs, line drawings, graphs, and maps should be termed figures. Photos must be clear and have good contrast. Please, organize, whenever possible, line drawings (including graphics, if it is the case) as plates of figures or pictures considering the size of the page of the journal. The size of an illustration, if necessary, should be indicated using horizontal or vertical scale bars (never as a magnification in the legend). Each figure must be numbered in Arabic numerals in the lower right corner. When preparing the illustrations, authors should bear in mind that the journal has a matter size of 17.0 by 21.0 cm and a column size of 8,3 by 21,0 cm including space for captions. Figures must be referred to in numerical sequence in the text; indicate the approximate placement of each figure in the margins of the manuscript. All figures should be inserted at the end of the text, following the tables for review purposes. The authors should be aware that, if accepted for publication in **ZOOLOGIA**, all figures and graphics should be sent to the editor in the adequate quality (below). Illustrations must be saved and sent as separate TIFF files with LZW compression. The required final resolution is 300 dpi for color photos and 600 dpi for half-tone photos or line art. The illustration files should be uploaded to the submission system as a supplementary

file. Upload is limited to 10 MB per file. Color figures can be published if the additional cost are covered by the authors. Alternatively, the authors may choose to publish black and white illustrations in the paper version of the manuscript and retain the color versions in the electronic version at no additional cost. These same figures should be incorporated, with good lower resolution, directly in the manuscript for review purposes only, each in a separate page at the end of the manuscript. Captions of the figures should be typewritten right after the Literature Cited. Use a separate paragraph for the caption of each figure or group of figures. Please, note previous publications and follow the pattern adopted for captions.

Tables. Tables should be generated by the table function of the word-processing program being used, numbered in Roman numerals and inserted after the list of figures captions. Do not use paragraph marks inside of table cells. Legends are provided immediately before each respective Table.

Short Communications

Manuscripts are to be organized in a format similar to original articles with the following modifications.

Text. The text of a research note (i.e. Introduction + Material and methods + Discussion) is written directly, without sections. Acknowledgments may be given, without heading, as the last paragraph. Literature is cited in the text as described for articles.

Literature cited, figures captions, tables, and figures. These items are in the form and sequence described for articles.

Opinions

Title. Simply provide a title for the opinion.

Text. Should be concise, objective and contain no figures (unless absolutely necessary).

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

Book reviews

Title. Give the title of the book, cited as indicated below:

Toxoplasmosis of Animals and Man, by J.P. Dubey & C.P. Beattie. 1988. Boca Raton, CRC Press, 220p.

The words "edited by" are substituted for "by" when appropriate.

Text. The text usually is not subdivided. If literature must be cited, a headed literature cited section follows the text in the style described for articles. Figures and tables should not be used.

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

Short Biographies

Title. Give the name of the person for which this biography is being written in boldface, followed by the date of birth and death (if it is the case), in parenthesis.

Lauro Travassos (1890-1970)

Text. The text usually is not subdivided. If literature must be cited, a headed literature cited section follows the text in the style described for articles. Figures and tables should not be used.

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

PROCEDURES

Manuscripts submitted to **ZOOLOGIA** will be initially evaluated by the Managing and Assistant Editor for adequacy and to determine the specific area. A first evaluation of the English (if it is the case) is performed at this moment. Manuscripts with problems may be returned to the authors. Once the area is determined/confirmed, the manuscript is sent to the appropriate Section Editor by the Managing Editor. The Section Editor sends the manuscript for Reviewers. The copies of the manuscript with the Reviewers' comments and the Section Editor's decision will be returned to the corresponding author for evaluation. The authors have up to 30 days to respond or comply to the revision and return revised version of the manuscript to the adequate area of the electronic system. Once approved, the original manuscript, Reviewers comments, Section Editor's comments, together with the corrected version and the respective figure files, properly identified, are returned to the Managing Editor. Exceptionally, the Managing Editor may, after consultation with the Section Editors, modify the recommendation of the Reviewers and Section Editor, based on adequate justification. Later changes or additions to the manuscript may be rejected. A copyedited version of the manuscript is sent to authors for approval. It represents the last chance for the author to make any

substantial changes to the text, as the next stage is restricted to typographic and formatting corrections. Electronic proofs will be submitted to the corresponding author prior to publication for approval.

REPRINTS

The corresponding author will receive an electronic reprint (in PDF format) after publication. Authors may print and distribute hardcopies of their article on demand. Authors may also send the electronic file to individuals, as one would send a printed reprint. However, we would appreciate if you refrain from distributing PDF files via discussion groups and bulk-mail systems. It is important for **ZOOLOGIA** that users access the journal homepage for statistical purposes. By doing this, you are helping increase the indexes of quality of **ZOOLOGIA**.

VOUCHER AND TYPE SPECIMENS

Manuscripts must report the museums or the institutions where the specimens (types or vouchers) are deposited and respective deposit numbers whenever possible.

Submission of manuscripts

Only online submissions will be accepted, through the following address: <http://submission.scielo.br/index.php/rbzool/index>.