

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE CENTRO DE BIOCIÊNCIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Estrutura genética populacional de *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene* (Lepidoptera: Nymphalidae) em fragmentos de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte

NATAL/RN 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

PRISCILA ALBUQUERQUE DE MOURA

Estrutura genética populacional de *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene* (Lepidoptera: Nymphalidae) em fragmentos de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Rio Grande do Norte e como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. Dr. MÁRCIO ZIKÁN CARDOSO

NATAL/RN 2009 Divisão de Serviços Técnicos

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Moura, Priscila Albuquerque de.

Estrutura genética populacional de *Heliconius erato e Heliconius* melpomene (Lepidoptera:Nymphalidae) em fragmentos de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte / Priscila Albuquerque de Moura. - Natal, RN, 2009.

81 f.

Orientador: Márcio Zikán Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

 Estrutura populacional – Dissertação. 2. Heliconius – Dissertação.
Microssatélites – Dissertação. 4. AFLPs – Dissertação. 5. DNA mitocondrial – Dissertação. I. Cardoso, Márcio Zikán. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 574.3(043.3)

TERMO DE APRESENTAÇÃO

PRISCILA ALBUQUERQUE DE MOURA

ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE *HELICONIUS ERATO* E *HELICONIUS MELPOMENE* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA DO RIO GRANDE DO NORTE

Dissertação submetida como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia do Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRN.

Aprovada por:

Prof. Dr. Márcio Zikán Cardoso (UFRN) - Orientador

Prof. Dr. Wagner Franco Molina (UFRN) - Examinador Interno

Profa Dra. Rosane Garcia Colevatti (UFG) – Examinador Externo

Natal, 24 de julho de 2009.

Agradecimentos

A Márcio Zikán Cardoso, meu orientador e amigo, pelo incentivo desde a graduação, pelo apoio e paciência nestes últimos dois anos, pelos cafés expressos, almoços no shopping e raras cervejas e, sobretudo, por ter me confiado este maravilhoso projeto. Eu, sinceramente, espero que meus orientadores do doutorado sejam no mínimo tão legais quanto ele, só que um pouco menos esquecidos.

A Marcus R. Kronforst, meu segundo orientador e amigo, pela oportunidade única de desenvolver todos os meus experimentos no FAS Center for Systems Biology (Harvard University), pelo suporte financeiro que recebi em Cambridge (Massachusetts, EUA), pelo incentivo moral fora de série, pelos inúmeros almoços e algumas farras memoráveis.

À professora Katia Castanho Scortecci, pela minha reintrodução à vida de laboratório no início do mestrado, pela paciência com os géis de sequenciamento (ainda bem que não precisei usá-los) e pela sugestões e críticas durante minha qualificação. Ao professor Wagner Molina, também pela contribuição na qualificação.

Aos meus tutores e colegas de laboratório, os post-docs Mark D. Clements e Swee Peck Quek, pelo valioso treinamento durante minhas primeiras semanas em Harvard e pelas intermináveis idas e vindas à sala dos sequenciadores. Sem eles, eu não seria ninguém.

À minha amiga, irmã de coração e colega de laboratório, Nicola Louise Chamberlain, pelo suporte emocional durante meus seis meses em Cambridge, pelas risadas intermináveis, pelas inúmeras idas aos pubs. Sem ela e sem meu amigo Wook Kim, minha vida em Harvard teria tido menos graça.

Àqueles cuja autorização para coletas foi imprescindível para a realização do meu trabalho: Tenente Cássio (Base Aérea de Natal – Mata do Catre), Professor Adauto Chianenti (Escola Agrícola de Jundiaí) e Paulo Roberto Medeiros (FLONA de Nísia Floresta). A simpatia e disponibilidade dos três me fez acreditar que o altruísmo existe. Ao ICMBio, pela licença de coletor permanente, que nos permitiu as coletas. Aos colegas que me ajudaram nas coletas, o prestativo Soldado Diogo (Base Aérea de Natal), Daniel Oliveira, José Elieudo, Israelian, Alexandre Fillipo, Luciana Lopes e Emmanuele Séfora. Obrigada também a Luiz Vicente Burle Maciel, pela confecção do mapa dos fragmentos. Valeu pela disponibilidade!

Aos amigos, que sempre estiveram por perto (mesmo aos que estavam há milhares de quilômetros). Em especial a Thayse Azevedo, Patrícia Mesquita, Emille Dantas e Mikkel Avlund. Viva ao MSN, ao Skype, ao Orkut, ao facebook e, logicamente, às farras!

Por último, mas não menos importante, à minha família, pelo apoio e incentivo à minha carreira acadêmica. Ao meu irmão e segundo pai, Marcel Stanley, pelo amor incondicional e suportes emocional e financeiro. E aos meus pais, Ezequias e Verônica Moura, por tudo, tudo mesmo! O que seria de mim sem vocês?

Sumário

Resumo	7
Abstract	13
Introdução	15
Fluxo gênico como agente homogeneizador das populações naturais	15
Métodos utilizados na quantificação do fluxo gênico	
Borboletas como sistemas-modelo	20
Borboletas do gênero Heliconius	21
Espécies em estudo	25
Material e Métodos	27
Processamento das amostras	27
Comparative population genetics of mimetic Heliconius butterflies in an end habitat; Brazil's Atlantic Forest	angered 38
Referências Bibliográficas	64
Anexos	73

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Table 1 Species and specimens of <i>Heliconius</i> collected in the eight fragments studied in Rio Grande do Norte, Brazil
Table 2 Microsatellite locus used for Heliconius erato and Heliconius melpomene specimens collected in the present study
Table 3 Summary of <i>H. erato</i> and <i>H. melpomene</i> populations multilocus estimates of F_{ST} and IBD (isolation by distance) values for AFLP, microsatellites and mtDNA generated by1000 permutations Espécime em tubo Eppendorf preenchido com etanol e devidamentemarcado54
Table 4 <i>H. erato</i> populations pairwise, multilocus estimates of F_{ST} for AFLP are shown below the diagonal, F_{ST} for microsatellites above, both generated by 1000 permutations [* P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001, (no asterisk) = not significant]
Table 5 <i>H. melpomene</i> populations pairwise, multilocus estimates of F_{ST} for AFLP are shown below the diagonal, F_{ST} for microsatellites above, both generated by 1000 permutations [* P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001, (no asterisk) = not significant]
Table 6 Standard diversity indices for all populations of <i>H. melpomene</i> , using mitochondrial DNA. 55
Table 7 Standard diversity indices for all populations of <i>H. erato</i> , using mitochondrial DNA55

•

•

LISTA DE ANEXOS

- Anexo I Caracterização dos fragmentos de Floresta Atlântica usados neste estudo
- Anexo II Lista de indivíduos coletados nos oito fragmentos estudados

LISTA DE SIGLAS

AFLP	Amplified fragment lenght polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MR	Marcação-recaptura
MSATS	Microssatélites
MTDNA	DNA mitocondrial
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Resumo

Estudos utilizando marcadores moleculares em borboletas têm mostrado como uma paisagem altamente fragmentada pode resultar na redução do fluxo gênico entre as manchas de habitat e, conseqüentemente, aumentar a diferenciação genética entre as populações. No entanto, pouco se sabe sobre a estrutura geográfica e os efeitos da fragmentação sobre a conectividade das populações do gênero Heliconius. Além disso, as conclusões sobre os efeitos da estrutura populacional sobre a dinâmica da evolução do mimetismo de borboletas do gênero Heliconius precisam ser testados em espécimes de H. erato e H. melpomene encontrados em outros locais, além dos da América Central norte da América do Sul. Neste estudo, tivemos duas motivações: (1) comparar a estrutura populacional de H. erato e H. melpomene dada a elevada fragmentação do Mata Atlântica Brasileira, e (2) estudar a estrutura populacional de espécies co-mímicas poderia nos fornecer *insights* a respeito da dinâmica da evolução do mimetismo. Para isso, analisamos a estrutura espacial e conectividade de oito populações de Heliconius, em um total de 137 espécimes de H. erato e 145 de H. melpomene, utilizando nove loci de microssatélites, 1144 marcadores AFLPs e 282 sequências de DNA mitocondrial. Em geral, ambas as espécies apresentaram evidências de subdivisão populacional, mas nenhum isolamento por distância indicando alguma diferenciação genética entre as populações. Contrariamente ao Heliconius da Costa Rica (Kronforst & Gilbert 2008), H. melpomene exibiu maior diferenciação genética que H. erato, baseado em marcadores nucleares. No entanto, para DNA mitocondrial, as populações de H. erato apresentaram maior diferenciação genética que H. melpomene. Nossos resultados corroboram com outros estudos sobre Heliconius no tocante à subdivisão populacional e deriva gênica local encontrada neste gênero. No entanto, o padrão dessa diferenciação varia significativamente do padrão encontrado em estudos realizados na América Central, onde *H. erato* é geralmente mais diferenciado e estruturado. Esse padrão pode refletir diferentes histórias evolutivas de espécies de *Heliconius* na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil.

Abstract

Extensive studies using molecular markers on butterflies have shown how a highly fragmented landscape may result in the reduction of gene flow among patches of habitat and, consequently, increase genetic differentiation among populations. However, little is known about *Heliconius*' geographical structure and the effects of fragmentation on the connectivity of populations. Furthermore, findings on the effects of the population structure on the dynamics of mimicry evolution in *Heliconius* butterflies need to be tested in *H. erato* and *H. melpomene* specimens found in other locations other than Central and northern South Americas. For the present study, we had two motivations: (1) compare the population structure of *H. erato* and *H. melpomene* given the highly fragmented Brazil's Atlantic Forest habitat; and (2) studying population structure of co-mimics could give us insights into the dynamics of mimicry evolution. For this, we analysed the spatial structure and connectivity of eight populations of Heliconius butterflies, in a total of 137 H. erato specimens and 145 H. melpomene specimens, using nine microsatellites loci, 1144 AFLPs markers and 282 mitochondrial DNA sequences. In general, both species exhibited evidence of population subdivision but no isolation by distance indicating some extent of genetic differentiation among populations. Contrary to Kronforst & Gilbert's (2008) Costa Rican Heliconius, H. melpomene exhibited more genetic differentiation than H. erato based on nuclear markers. However, for mitochondrial DNA, H. erato populations showed more genetic differentiation than H. melpomene. Our results corroborate to other studies on Heliconius butterflies concerning the pronounced population subdivision and local genetic drift found in this genus. Nevertheless, the pattern of this differentiation varies significantly from the pattern found in studies conducted in Central America, where *H. erato* is generally more differentiated and structured than *H. melpomene*, based on nuclear markers. This different pattern may reflect different evolutionary histories of *Heliconius* species in Northeastern Brazil's Atlantic Forest.

Introdução

A variação espacial da paisagem exerce uma influência fundamental sobre a distribuição das populações e, por conseguinte, afeta suas estruturas demográfica e genética (Roderick 1996). Tal variação exprime-se em barreiras, como desertos, oceanos, cadeias de montanhas, ecótonos que, aliadas a fatores ecológicos, como clima, predadores, competidores e recursos, podem influenciar a estrutura populacional (Slatkin 1987). Com isso, algumas populações encontram-se estruturadas de forma contínua enquanto outras exibem uma distribuição fragmentada.

As populações de quase todas as espécies exibem algum grau de diferenciação genética ao longo de sua distribuição geográfica (Avise 2004). Esses padrões geográficos da variação genética refletem tanto processos históricos bem como o fluxo gênico contemporâneo, resultante das características biológicas do organismo em estudo (Fauvelot & Planes 2002, Epperson 2003).

Fluxo gênico como agente homogeneizador das populações naturais

O fluxo gênico inclui todos os mecanismos que resultam na transferência de alelos de uma população para outra (Slatkin 1985; Scribner *et al.* 2005), podendo ocorrer de modo intra e, embora mais raro, interespecífico. Em outras palavras, é a proporção de novos genes imigrantes que se movem para uma determinada população como resultante do movimento de indivíduos ou de seus gametas (Endler 1977, Gerber *et al.* 2000). É uma força microevolutiva fundamental que pode determinar o potencial para a diferenciação

genética entre populações e para adaptação local, além de influenciar a dispersão geográfica de novas adaptações (Keyghobadi *et al.* 2005). Com fluxo gênico reduzido ou ausente, as populações poderão divergir e se diferenciar ao longo do tempo, tendo como consequência última a especiação (Lowe *et al.* 2004).

Independentemente do mecanismo, o fluxo gênico interpopulacional determina o quão as populações locais podem ser geneticamente diferenciadas (Slatkin 1985, 1987). O fluxo gênico pode tanto limitar a evolução, ao reduzir a adaptação a condições locais, ou promover evolução, ao disseminar novos genes e combinações de genes por todo o limite geográfico de uma espécie (Slatkin 1987). Quando a seleção natural conduz e mantém a divergência ecológica entre duas espécies, o fluxo gênico pode ter um impacto variável ao longo do genoma (Kronforst *et al.* 2006a, Kronforst 2008). Regiões do genoma que estão sob seleção divergente, ou que sofreram deriva gênica, podem aumentar e manter uma diferenciação significativa entre as duas espécies enquanto o fluxo gênico homogeneíza o resto do genoma (Slatkin 1987).

A natureza e extensão do fluxo gênico dependem amplamente de duas características biológias intrínsecas ao organismo: modo de reprodução e mobilidade dos indivíduos. Espécies com alta vagilidade – dispersoras – podem encontrar-se distribuídas ao longo de grandes distâncias e, desse modo, ter populações mais homogêneas (Haag *et al.* 1993, Vandewoestijne *et al.* 1999, Krauss *et al.* 2004), enquanto espécies com baixa vagilidade – sedentárias, por sua vez, têm populações mais estruturadas geneticamente numa escala espacial fina (Peterson 1996, Williams *et al.* 2003, Schmitt & Hewitt 2004). Espécies com dispersão dependente do sexo, onde um sexo dispersa e o outro é mais fiel ao território natal ou ao grupo social, pode afetar a distribuição de genes nos cromossomos

sexuais ou em genomas herdados apenas por via matrilinear, como o DNA mitocondrial (Lowe *et al.* 2004). O comportamento reprodutivo também é importante na determinação do fluxo gênico. Se indivíduos com alta vagilidade retornarem ao seu local de nascimento durante a época de reprodução (filopatria), então o fluxo gênico será severamente reduzido, causando diferenciação entre populações. O acasalamento preferencial também pode aumentar a estrutura espacial em espécies com baixa vagilidade (Lowe *et al.* 2004).

Além disso, a força relativa do fluxo gênico pode ser afetada por uma variedade de fatores ecológicos que variam intra- e interespecificamente, tais como especialização da dieta, assincronia fenológica entre populações, persistência do habitat, persistência populacional, e fatores ambientais como o ambiente físico, estrutura espacial do habitat em uma paisagem (Scribner *et al.* 2005) e distância geográfica (Ricklefs 2003).

Conhecer o grau de movimentação dos indivíduos da espécie a ser estudada é de suma importância no estudo da relação entre fluxo gênico e a estrutura espacial do habitat ou conectividade da paisagem (Roderick 1996, Scribner *et al.* 2005). Segundo os ecólogos de paisagem, a conectividade da paisagem é definida como o grau ao qual a estrutura de uma paisagem ajuda ou impede o movimento das espécies (Keyghobadi *et al.* 2005). Uma paisagem está bem conectada quando os organismos podem se movimentar prontamente entre os fragmentos de habitat por longo prazo. Como as paisagens são compostas por diferentes fragmentos com atributos físicos diferentes, a conectividade não é apenas um elemento da paisagem; é também um atributo de cada fragmento.

Métodos utilizados na quantificação do fluxo gênico

Para se estimar os níveis de fluxo gênico de uma espécie, existem dois métodos empregados: o direto e o indireto. O primeiro utiliza estimativas de distâncias de dispersão e sucesso reprodutivo dos dispersores para inferir o quanto de fluxo gênico está ocorrendo no período em que as observações estão sendo realizadas (Slatkin 1987, Roderick 1996). Um dos métodos utilizados para tal é a técnica de marcação e recaptura (MR), a qual fornece evidências diretas de movimento de indivíduos dentro, fora, ou entre manchas de habitat. Em sistemas bem estudados, estas estimativas têm fornecido informações essenciais para o entendimento desta dinâmica, como, por exemplo, nos estudos da borboleta Melitea cinxia na Finlândia (Hanski 1994, Hanski et al. 1995, Ehrlich & Hanski 2005). Além disso, estudos de MR de espécies-praga têm revelado padrões importantes de deslocamento (Schneider 1999). No entanto, técnicas de MR, como qualquer técnica direta, são limitadas, pois é necessário marcar um grande número de indivíduos em um grande período de tempo e espaço para se ter a chance de obter recapturas suficientes para estimar uma mudança em freqüência gênica de forma adequada (Slatkin 1987, Roderick 1996), uma vez que a mesma se processa em um longo espaço de tempo. Quando se trata de movimento dentro da unidade populacional propriamente dita, isto se torna menos complicado. Porém, quando se quer estimar movimento entre múltiplas unidades populacionais, isso pode se transformar em um esforço amostral extremamente grande e com um custo alto, a depender do organismo e da escala espacial do estudo. Além disso, métodos diretos medem de fato dispersão de indivíduos, não fluxo gênico.

Por outro lado, estimativas indiretas de fluxo gênico baseadas em marcadores genéticos podem fornecer pistas valiosas sobre o grau de conectividade das unidades populacionais (Slatkin 1985, 1987, Roderick 1996, Berry *et al.* 2004), ao revelar de modo eficiente os efeitos cumulativos do fluxo gênico contemporâneo e histórico em um estudo de larga escala espacial (Scribner *et al.* 2005). Ferramentas moleculares para análise de genética populacional, como genotipagem e seqüenciamento de DNA, combinadas com uma gama de novos métodos analíticos nos permitem quantificar os efeitos da estrutura da paisagem nos padrões geográficos da variação genética, como o fluxo gênico entre populações de uma mesma espécie e também entre populações de espécies com ancestralidade comum (Avise 2004, Scribner *et al.* 2005 Kronforst *et al.* 2006a), evidenciado as unidades populacionais em uma escala espacial maior.

Em insetos, essas ferramentas podem ser incorporadas a modelos demográficos de multi ou metapopulações, os quais vêm sendo utilizados no entendimento da distribuição das populações em habitats natural ou artificialmente fragmentados, enfocando as conseqüências da migração entre populações locais e a persistência regional de espécies com populações locais instáveis (Roderick 1996, Schmitt & Hewitt 2004).

Os efeitos do grau de fragmentação da paisagem na conectividade das populações (Krauss *et al.* 2004), do tamanho e qualidade dos fragmentos e do isolamento entre eles sobre a migração, a colonização e a extinção de populações são incorporados ao modelo de metapopulações (Begon *et al.* 2006). Outras conseqüências importantes da fragmentação são o isolamento reprodutivo e a diminuição da diversidade genética nas populações, que aumenta ainda mais o risco de extinção devido ao declínio na aptidão dos indivíduos (Harrison & Hastings 1996, Williams *et al.* 2003, Schmitt & Hewitt 2004, Scribner *et al.* 2005). A determinação dos efeitos da estrutura da paisagem na estrutura espacial das populações pode levar a um teste mais preciso das teorias genéticas de população e nos

permite predizer os impactos das mudanças antropogênicas na paisagem na integridade genética das espécies (Keyghobadi *et al.* 1999, Harper *et al.* 2003, Schmitt & Hewitt 2004).

Borboletas como sistemas-modelo

O vasto conhecimento da biologia e ecologia de Lepidoptera tem levado à utilização extensiva de muitas espécies de borboletas como sistemas-modelo de dinâmica populacional e genética de espécies ameaçadas pela fragmentação e perda de habitat (Harper et al. 2003). Estudos realizados com marcadores moleculares de alta resolução têm mostrado, mesmo em pequena escala espacial (Parnassius smintheus, [Keyghobadi et al. 1999, 2005], Parnassius apollo [Lushai et al. 2000], Synemon plana [Clarke & O'Dwyer 2000]), como um ambiente altamente fragmentado pode levar à diminuição do fluxo gênico entre manchas de habitat e, conseqüentemente, ao aumento de diferenciação genética entre populações. A variabilidade genética - intra ou interpopulacional - é geralmente mais afetada em manchas menores de habitat ou em populações com um número menor de indivíduos (Polyommatus coridon [Schmiit & Seitz 2002, Krauss et al. 2004]). Algumas espécies com maior grau de movimentação são mais susceptíveis à fragmentação (Speyeria idalia, Nymphalidae, Williams et al. 2003; Aglais uticae, Nymphalidae, Vandewoestijne et al. 1999), o que resulta em uma maior diferenciação genética interpopulacional, uma vez que esses organismos têm seu fluxo gênico comprometido. Entretanto, apesar de tanta informação a respeito da relação fragmentação-diversidade genética em borboletas, muitos desses estudos têm sido realizados em ambientes temperados (Debinski 1994, Keyghobadi et al. 1999, Krauss et al. 2004, Vandewoestijne et al. 2004). Até o momento, poucos são os estudos deste tipo realizados com borboletas no continente americano, em particular na Mata Atlântica – bioma altamente fragmentado e considerado como *hotspot* de biodiversidade, sendo uma área prioritária para conservação (Myers *et al.* 2000).

Significativa porção da Mata Atlântica brasileira existe hoje em forma de fragmentos, com poucas áreas contínuas. Boa parte dos estudos em ecologia no Brasil tem se voltado para as conseqüências da fragmentação sobre ecossistemas naturais, em especial aqueles de Mata Atlântica. Estimativas recentes mostram que restam apenas 5% de floresta na Mata Atlântica nordestina, nome dado à extensão de floresta sazonal localizada ao norte da foz do São Francisco (Silva & Casteleti 2003). Provavelmente, o terreno com poucos acidentes de relevo e a longa ocupação humana desde o início da colonização do país contribuíram para a reduzida taxa de remanescentes nesta região. No entanto, esta é uma região muito pouco conhecida cientificamente e com extrema relevância conservacionista (Silva & Casteleti 2003).

Borboletas do gênero Heliconius

Borboletas do gênero *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae; Kluk 1780) estão dentre os organismos tropicais mais bem estudados em ecologia e evolução (Brown Jr. 1981, Beltrán *et al.* 2002). São espécies conspícuas comumente encontradas em florestas secundárias tropicais e subtropicais úmidas do Novo Mundo (Hang *et al.* 1993). Sua taxonomia é razoavelmente conhecida e uma grande quantidade de informações sobre aspectos de sua ecologia encontra-se disponível. Todas as espécies colocam ovos em plantas da família Passifloraceae; o ciclo da larva é relativamente curto, com cerca de 20 dias entre oviposição e eclosão do adulto. Os adultos podem alcançar até seis meses de idade, um período longo de vida em Lepidoptera. Adultos alimentam-se de pólen e néctar, sendo uma característica única dentre os Lepidoptera (Gilbert 1972). Esse gênero também possui como características um comportamento de área de vida, formação de dormitórios noturnos, fabricação de um espermatóforo rico em glicosídeos cianogênicos, impalatabilidade a predadores e a existência de um sistema de acasalamento na pupa em algumas espécies (Turner 1971, Ehrlich & Gilbert 1973, Gilbert 1975, 1991, Mallet 1986a, Brower 1996, Cardoso & Gilbert 2007). Além disso, sua diversidade intra e interespecífica de padrões cromáticos nas asas os tornou um modelo clássico no estudo de mimetismo (Sheppard *et al.* 1985, Mallet & Gilbert 1995, Kapan 2001, Joron 2005). A diversidade interespecífica deve-se ao mimetismo Mülleriano, mantido através de uma seleção normalizadora, enquanto muitas espécies exibem inúmeros polimorfismos geográficos intra-específicos (Mallet & Barton 1989, Brower 1996).

Estudos de dinâmica populacional em *Heliconius*, utilizando método de marcação e recaptura (MR), mostram que as populações se mantêm razoavelmente estáveis ao longo do tempo, geralmente em baixas densidades (Gilbert 1991). Indivíduos adultos de *Heliconius*, após um breve período de dispersão, estabelecem-se em áreas onde permanecem pelo resto de suas vidas (Mallet 1986b). Assim, populações de *Heliconius* constituem-se em unidades moderamente sedentárias, com pouco movimento de indivíduos, aparentemente como resultado do comportamento de "home-range" (Saafeld & Araújo 1981, Mallet 1986b, Ramos 1999). Tal comportamento pode ser observado no uso de rotas de forrageio específicas pelas quais os indivíduos retornam diariamente às plantas hospedeiras dos adultos, que fornecem néctar e pólen, e às das larvas, para oviposição e cópula (Turner

1971, Ehrlich & Gilbert 1973), além da fidelidade aos dormitórios (Brown 1981, Mallet 1986a). Esses comportamentos pressupõem que os indivíduos se deslocam muito pouco, o que sugere que o fluxo gênico entre populações separadas geograficamente pode ser baixo.

Recentemente, com o advento de técnicas moleculares, *Heliconius* tem se tornado um modelo para estudos na linha de evolução e desenvolvimento ("*evo-devo*") e estudos de biologia evolutiva em irradiação adaptativa (Turner *et al.* 1979), introgressão genética em zonas híbridas (Gilbert 2003, Mallet 2005, Kronforst *et al.* 2006a, Bull *et al.* 2006), origem evolutiva do mimetismo em diferentes subespécies de *H. erato* (Brower 1994), filogeografia (Brower 1996, Flanagan *et al.* 2004), diversidade do padrão de coloração das asas (Mallet & Joron 1999, Naisbit *et al.* 2003, Reed & Gilbert 2004, Joron *et al.* 2006), mapa genético (Tobler *et al.* 2005, Papanicolaou *et al.* 2005), diversidade de coloração de asas (Joron *et al.* 2006), arquitetura genética (Kronforst *et al.* 2006b), preferência na escolha do parceiro (Kronforst *et al.* 2006c) e origem evolutiva de acasalamento na pupa (Beltrán *et al.* 2007).

Apesar da grande variedade de estudos sobre *Heliconius*, pouco se sabe sobre sua estrutura geográfica e dos efeitos da fragmentação na conectividade das populações. Muitos dos trabalhos publicados envolvem estudos apenas usando o método MR (Saafeld & Araújo 1981, Mallet 1986b, Ramos 1999) e estudos com marcadores moleculares ainda são pouco conclusivos. Kronforst & Fleming (2001) examinaram a estrutura genética populacional de *Heliconius charithonia* no sudoeste da Flórida usando aloenzimas e encontraram uma baixa diversidade genética ao longo da área e nenhuma evidência de subdivisão genética. Outros estudos com os mesmos marcadores genéticos em outras espécies de *Heliconius* também não mostraram nenhuma evidência de diferenciação

genética (Turner *et al.* 1979, Jiggins *et al.* 1997). Entretanto, Kronforst & Gilbert (2008), em estudo utilizando AFLPs – marcadores distribuídos em todo o genoma – encontraram diferenciação genética entre populações de seis diferentes espécies de *Heliconius* da Costa Rica.

Mais estudos com outras populações de *Heliconius* utilizando mais de um tipo de marcador molecular seriam certamente mais elucidativos no estudo da estrutura geográfica desse gênero em ambientes fragmentados. Para tal, no presente estudo, usaremos duas espécies do gênero *Heliconius – H. erato* (Linnaeus 1764) e *H. melpomene* (Linnaeus 1758) – para avaliar o grau de diversidade genética em populações vivendo em fragmentos de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte. Em particular, sabe-se pouco sobre a relação entre fragmentação e a diversidade genética das populações que vivem nestas manchas de habitat (Grativol *et al.* 2001). Ao prover dados essenciais sobre conectividade e diversidade genética em populações ambientais tenham mais subsídios no planejamento de recuperação de fragmentos e corredores ecológicos (p.ex. Haddad 1999, Hale *et al.* 2001). Para isto, este estudo usa marcadores moleculares altamente variáveis (microssatélites, AFLPs) e DNA mitocondrial, para detectar padrões geográficos de estrutura populacional genética dessas duas espécies.

A ausência de outras espécies deste gênero no estado do Rio Grande do Norte (MZ Cardoso, comunicação pessoal, Brown 1974, Flanagan 2004) nos faz suspeitar que os fragmentos de matas umbrófilas próximas ao município de Natal representam o limite da distribuição, ou, corresponde a sítios além do limite da distribuição de várias espécies, o que poderia refletir numa menor diversidade genética devido aos efeitos da fragmentação (Bourn & Thomas 2002, Krauss *et al.* 2004).

Espécies em estudo

Heliconius erato e *H. melpomene* são espécies co-mímicas pertencentes a dois diferentes grupos evolutivos de *Heliconius*. Essas duas espécies distantemente relacionadas exibem um padrão de coloração das asas quase idêntico ao longo de sua distribuição geográfica simpátrica nas Américas Central e do Sul, apresentando aproximadamente 30 diferentes padrões fenotípicos compartilhados dependendo da região geográfica (Brown *et al.* 1974). Existem duas hipóteses que explicam esse padrão. A clássica descreve que ambos sofreram irrradiação adaptativa infragenérica, enquanto a hipótese alternativa argumenta que uma maior variabilidade genética em *H. erato* prediz que esta espécie se diversificou antes de *H. melpomene*, servindo como modelo comimético para esta última (Flanagan *et al.* 2004).

No Rio Grande do Norte, bem como em toda costa leste brasileira, as subespécies de *H. erato (H. erato phyllis)* e *H. melpomene (H. melpomene nanna)* apresentam o fenótipo "*postman*" (Figura 1), cujo padrão de cor é predominantemente preto, com faixas vermelhas e amarelas. Apesar de parecidas superficialmente, é possível distingui-las pelo tamanho, modo de vôo e pela presença de pequenas manchas amarelas sob as asas posteriores de *H. erato*.

O objetivo geral deste estudo consiste em analisar a estrutura genética e a conectividade em populações de *Heliconius* em fragmentos de Mata Atlântica do Estado do Rio Grande. Com este estudo, esperamos evidenciar se: (1) *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene* possuem uma estrutura genética significativa nos fragmentos de Mata Atlântica estudados ao medir o fluxo gênico, (2) a estrutura populacional genética dessas duas

espécies pode ser afetada pela distância entre fragmentos, (3) existe isolamento pela distância (IBD), (4) se pode traçar uma distribuição de haplótipos das populações estudadas ao se observar o fluxo gênico materno, (5) existe diferença entre o uso de microssatélites e AFLPs no estudo de subduvisão populacional.



Figura 1: Espécies de Heliconius do fenótipo postman: H. erato (acima) e H. melpomene (abaixo).

Material e Métodos

Processamento das amostras

Quando capturado, cada indivíduo recebeu uma identificação correspondente às iniciais do fragmento de onde o mesmo foi capturado e o número do indivíduo. Em seguida, foi acondicionado em um envelope entomológico (7 x 5 cm; Figura 2) e colocado em uma câmara úmida a fim de permitir a sobrevivência das borboletas até o laboratório, onde foram mantidas em um freezer (-80°C) até a realização da análise molecular. Posteriormente, cada indivíduo teve as asas cortadas e mantidas em seus respectivos envelopes, enquanto o restante do corpo (cabeça, antenas, abdômen e tórax) foi colocado em um tubo Eppendorf de 1,5 ml com etanol 95%, devidamente marcado e selado com Parafilm[®] (Figura 3). Todos os tubos foram mantidos em geladeira à temperatura de 4°C durante dois dias e, então, transferidos para um freezer comum.



Figura 2: Exemplo de envelope entomológico com os dados do espécime coletado.



Figura 3: Espécime em tubo Eppendorf de 1,5 ml preenchido com etanol e devidamente marcado.

Análise molecular

A fim de realizar o isolamento do DNA, foi utilizado o protocolo *Spin-Column* da $Qiagen^{(0)}$ para extração de tecido animal. Primeiramente, 3/5 do abdômen de cada indivíduo foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para outro tubo Eppendorf de 1,5 ml, onde foram adicionados 180 µl de Buffer ATL para lise do tecido animal. Para digestão das células do tecido do abdômen, foram adicionados ao mesmo tubo 20 µl de proteinase K que, em seguida, foi misturado por *vortex* e incubado à 56°C por 3 horas. A cada 1h cada um dos tubos teve seu conteúdo devidamente misturado por *vortex*.

Após o término do período de incubação, cada tubo teve seu conteúdo novamente misturado por *vortex* por 15 segundos. Para purificação do DNA, foram adicionados 200 µl de Buffer AL e 200 µl de etanol absoluto a cada uma das amostras, sendo misturados por *vortex* após cada uma das adições. Com auxílio de micropipeta, cada uma das amostras foi transferida para *DNeasy Mini spin columns* inseridos em tubos de coleta de 2 mL. Todas as amostras foram centrifugadas (8000rpm durante 1 minuto) e os tubos de coleta foram

descartados. Para precipitação do DNA, cada um dos *spin columns* foi transferido para um novo tubo de coleta, sendo adicionados 500 μ l de Buffer AW1 a cada um dos tubos, os quais foram centrifugados (8000rpm durante 1 minuto). Os tubos de coleta foram novamente descartados e os *spin columns* novamente transferidos para novos tubos, sendo então adicionados 500 μ l de Buffer AW2 e levados para a centrífuga (14000rpm durante 3 minutos). Para diluição do DNA, os *spin columns* foram transferidos para novos tubos Eppendorf de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 100 μ l de Buffer AE, incubados por 1min à temperatura ambiente e então centrifugados (8000rpm durante 1 minuto). Para obtenção de maior quantidade de DNA, esse procedimento foi repetido mais uma vez. O DNA obtido foi quantificado utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* e mantido sob duas formas: DNA estoque (amostras estocadas a -80°C); e DNA de bancada (DNA estoque diluído na proporção 1:1; 25 μ l do DNA estoque em 25 μ l de H₂O miliQ, mantidos a 4 °C), o qual foi utilizado para obtenção de marcadores moleculares (microssatélites e AFLPs) e seqüenciamento de mtDNA.

Microssatélites

Microssatélites são repetições em *tandem* de 1-6 nucleotídeos encontradas em alta freqüência nos genomas nucleares de muitos organismos, incluindo insetos (Goldstein *et al.* 1995, Zhang 2004, Selkoe & Toonen 2006). Consistem de seqüências curtas – geralmente 5 a 40 repetições – que se encontram aleatoriamente distribuídos ao longo do genoma (nDNA, cpDNA e mtDNA) e o tamanho de cada uma das repetições pode chegar a cerca de 500 pb (Lowe *et al.* 2004). Também referidos na literatura como STRs (*short tandem*

repeats), SSR (*simple sequence repeats*) e VNTR (*variable number tandem repeats*), os microssatélites são marcadores moleculares co-dominantes (nos permitem distinguir homozigotos de heterozigotos) que possuem aplicações em estudos de estrutura genética populacional (Jarne & Lagoda 1996, Roderick 1996, Lowe *et al.* 2004). Sua hipervariabilidade deve-se à alta taxa de mutação comparada a outras regiões neutras do DNA, sendo cerca de 10⁻³ ou 10⁻⁴ por locus por gameta por geração (Avise 2004). A enzima responsável pela amplificação do DNA, a DNA polimerase, pode adicionar uma cópia extra dos nucleotídeos, levando a uma versão modificada do microssatélite que pode ser passada para a geração subseqüente (Roderick 1996). Ao longo do tempo, uma determinada população poderá manter uma variedade de microssatélites que é característica daquela população e distinta de outras populações com as quais a mesma não intercruza. Esses marcadores ocorrem em partes não-codificantes do DNA, mas próximos a regiões codificantes conhecidas (Loxdale & Lushai 1998, Lowe *et al.* 2004, Zhang 2004), as quais servem como modelos para os *primers*.

Uma vez que se encontram amplamente dispersos em genomas eucarióticos, são hipervariáveis, codominantes e podem ser facilmente amplificados utilizando a técnica de PCR (Selkoe & Toonen 2006), os microssatélites têm sido utilizados amplamente em diferentes áreas, tais como medicina forense, no diagnóstico e identificação de doenças em humanos, em estudos de estrutura populacional (Harper *et al.* 2003, Ji *et al.* 2003, Koopman *et al.* 2007) e na biologia da conservação (Rowe & Beebee 2007, Underwood *et al.* 2007).

Apesar de notoriamente complicados para se obter em Lepidoptera (Zhang 2004), já existem vários microssatélites disponíveis para estudos populacionais em *Heliconius*

(Flanagan et al. 2002, Jiggins *et al.* 2005, Kapan *et al.* 2006, Mavárez & González 2006). Para obtenção de microssatélites no presente estudo, o DNA extraído de cada um dos 282 espécimes foi amplificado pela técnica da PCR, utilizando-se *primers* de microssatélites característicos de *Heliconius* (Flanagan *et al.* 2002, Mavárez & González 2006). Os espécimes das diferentes espécies foram amplificados usando diferentes pares de *primers*, selecionados após testes com vários *primers* disponíveis. Aqueles que obtiveram uma melhor amplificação foram utilizados neste estudo.

As PCR foram realizadas em 96-well plates, adicionando-se: 1 µl de Buffer de PCR 10X (Tris-HCL 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), 0,2 µl de dNTP 0,56 mM, 1 µl de MgCl₂ 2 mM, 0,1 µl de Taq DNA polimerase recombinante 10U, 1 µl de DNA 100 ng, 1 µl de *primer* senso, 0,5 µl de *primer* anti-senso, 1 µl de *primer marcador* – o qual se adapta aos demais *primers* com o intuito de evidenciar os tamanhos dos microssatélites (todos diluídos em H₂O MilliQ na proporção 1:100) e H₂O MilliQ para um volume final de 10 µl. O programa de termociclagem para amplificação foi conduzido em termociclador PTC-225 DNA Engine TetradTM Cycler, Bio-Rad[®], onde inicialmente o DNA foi desnaturado a 96°C por 6 minutos. Em seguida, houve 30 ciclos de desnaturação-anelamento-extensão com desnaturação realizada a 92°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 20 minutos.

Para tal, foram utilizados *96-well sequencing plates*, adicionando 8,5 µl de hi-di Formamide, 0,5 µl de marcador fluorescente GENESCAN-500 ROX (para visualização dos microssatélites no sequenciador) e 1 µl de DNA amplificado a cada um dos *poços*. A fim de separar as duplas hélices de DNA, as amostras foram submetidas a um choque térmico (95°C por 5 minutos e então 0°C por 5 minutos) e levadas para seqüenciador (*96 capillary ABI3730xl Genetic Analyzer*) para visualização de possíveis polimorfismos (de ausência ou presença de fragmentos e seus respectivos tamanhos). Após a genotipagem, os resultados foram visualizados utilizando-se o *software* ABI GeneMapper[®], onde foi observado quais indivíduos eram homozigotos ou heterozigotos para cada um dos microssatélites e também suas respectivas posições no genoma (em pares de base).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

A técnica de AFLP produz um grande número de marcadores polimórficos que se encontram distribuídos ao longo do genoma, sendo uma ferramenta muito útil para análises em genética populacional (Mueller & Wolfenbarger 1999). Apesar de serem mais numerosos que os microssatélites no genoma, os AFLPs possuem um menor nível de polimorfismo, característica que os faz serem menos aceitos em estudos de fluxo gênico. Diferentemente dos microssatélites – cujos *primers* são espécie-específicos, os *primers* utilizados são universais, o que torna maior o risco de contaminação cruzada (Selkoe & Toonen 2006). Entretanto, sua utilidade é de suma importância em estudos de diversidade genética, diferenciação populacional e hibridização (Lowe *et al.* 2004). Os AFLPs possuem herança dominante, uma vez que esta técnica mostra apenas a presença ou ausência de fragmentos de restrição ao invés de evidenciar o tamanho de fragmentos (Loxdale & Lushai 1998). O procedimento básico envolve a digestão de DNA genômico com duas enzimas de restrição (uma mais comum e outra mais rara), endonucleases com um sítio de reconhecimento de 4 e 6pb, levando à produção de fragmentos de restrição. Tais fragmentos, por sua vez, são anelados a adaptadores dupla-hélice de seqüência conhecida (uma seqüência principal e outra de uma enzima específica) e, então, biotinilados de modo que a reação em cadeia da polimerase (PCR) subseqüente amplifique apenas parte dos fragmentos (Avise 2004). Essa amplificação constitui em um processo de grande seletividade, onde na primeira fase – dita amplificação pré-seletiva – os *primers* são complementares aos adaptadores, mas possuem um par de bases adicional. A segunda amplificação – dita seletiva – utiliza o produto de PCR da amplificação pré-seletiva como *template* para amplificação com *primers* seletivos que são idênticos aos pré-seletivos, com exceção da adição de uma a três bases seletivas adicionais e também um marcador fluorescente ou radiativo (Lowe *et al.* 2004). O objetivo de tal processo seletivo é o de reduzir o número de fragmentos que serão detectados pelo seqüenciador.

No presente estudo, para a geração dos marcadores foi utilizado o *PE Applied Biosystems AFLP plant mapping kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), os quais foram separados com um ABI Prism 3100 genetic analyzer (PE Applied Biosystems). Quatro combinações de *primers* seletivos foram utilizados para gerar os fragmentos: EcoRI-ACT/MseI-CAT, EcoRI-ACT/MseI-CTG, EcoRI-ACA/MseI-CAT e EcoRI-ACA/MseI-CTG.

Para obtenção de AFLPs, foi preparado um *master mix* enzimático com 0,1 μ l de *Buffer* 10x T4 DNA ligase, 0,1 μ l de NaCl 0,5 M, 0,05 μ l de BSA 1 mg/mL, 0,1 μ l de Msel (a 1.000 unidades/mL), 0,05 μ l de EcoRI (a 100.000 unidades/mL) e 0,1675 μ l de T4 DNA ligase (a 400.000 ceUs/mL) e 0,4325 μ l de H₂O Milli-Q por amostra. As amostras foram preparas em 96-well plates e então submetidas a *spin* em microcentrífuga e estocadas por no máximo 2 horas. Para as reações de restrição-ligação, foram adicionados, por amostra, 1 µl de *Buffer* 10x T4 DNA ligase, 1 µl de NaCl 0,5 M, 0,5 µl de BSA 1 mg/mL, 1 µl de Msel *adaptor*, 1 µl de EcoRI *adaptor*, 2,5 µl de H₂O Milli-Q, 1 µl do *master mix* enzimático preparado previamente e 3 µl de DNA. As amostras foram misturadas, levadas à microcentrífuga por 10 segundos e então encubadas a 37°C por 3 horas em termociclador (PTC-225 DNA Engine TetradTM Cycler, Bio-Rad[®]). Para diluição das reações de restriçãoligação, foram adicionados 100 µl de *Buffer* TE_{0,1} a cada uma das amostras.

Posteriormente, para cada amostra, foi realizada uma amplificação pré-seletiva combinando 0,5 µl de primers de pré-amplificação para AFLP, 7,5 µl de core mix de AFLP e 2 µl de DNA diluído preparado durante reação de restrição-ligação. As amostras foram então levadas ao termociclador sendo submetidas a 72°C por 2 minutos e a 20 ciclos de desnaturação-anelamento-extensão com desnaturação realizada a 94°C por 20 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 60°C por 30 minutos. Para realização de amplificação seletiva, a cada uma das amostras foram adicionados 100 μ l de *Buffer* TE_{0.1}, das quais 1,5 μ l foram misturados a 0,5 μ l de Dye-primer-Axx de EcoRI a 1 μ M, 0,5 μ l de primer-Cxx de Msel a 5 μ M e 7,5 μ l de core mix de AFLP. As amostras foram levadas a termociclador e submetidas a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e então a 35 ciclos de desnaturação-anelamento-extensão, onde nos primeiros 10 ciclos, a desnaturação foi realizada a 94°C por 20 segundos; no primeiro ciclo de anelamento, a temperatura foi de 66°C por 30 segundos, diminuindo 1°C a cada ciclo (touchdown) e chegando a 57°C no décimo ciclo; a extensão foi de 72°C por 2 minutos. Os 25 ciclos restantes foram de 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e
72°C por 2 minutos. Em seguida, houve uma extensão final a 60°C por 30 minutos. As amostras foram mantidas a 4° C em geladeira após amplificação.

Para genotipagem dos produtos obtidos, foram combinados para cada amostra 0,4 µl de marcador fluorescente GENESCAN-500 ROX, 6,6 µl de hi-di Formamide e 3 µl do produto de reação de amplificação seletiva em um *96-well plate* para seqüenciamento. As amostras foram submetidas a um choque térmico (95°C por 5 minutos e então 0°C por 2 minutos) e levadas para seqüenciador (*96 capillary ABI3730xl Genetic Analyzer*) para visualização de possíveis polimorfismos (de ausência ou presença de fragmentos e seus respectivos tamanhos). Após seqüenciamento, os resultados foram visualizados utilizandos e o *software* ABI GeneMapper[®], através do qual foi observada a presença ou ausência dos fragmentos (AFLPs) em todos os indivíduos.

DNA mitocondrial (mtDNA)

O DNA mitocondrial tem sido utilizado como marcador molecular em uma gama de estudos taxonômicos e de estrutura populacional (Roderick 1996, Loxdale & Lushai 1998, Sperling 2003), incluindo também mimetismo em *Heliconius* (Brower 1996). Essa versatilidade de aplicações deve-se à falta de recombinação (Simon *et al.* 1994) e à rápida evolução do mtDNA, o qual pode sofrer mutação cerca de 20 vezes mais rápido que o DNA nuclear devido à ineficiência nos mecanismos de reparo (Brown *et al.* 1979), permitindo diferenciar os indivíduos até o nível de subespécie. Outra vantagem da utilização do mtDNA é a de que o mesmo é mais numeroso que o DNA nuclear, sendo, portanto, mais

fácil de ser detectado em amostras mais antigas (Loxdale & Lushai 1998). A herança matrilinear do mtDNA permite que esse marcador seja utilizado na indicação do fluxo gênico materno (Avise 2004, Scribner *et al.* 2005). Além disso, isso significa dizer que o mtDNA possui um quarto (¼) do tamanho populacional efetivo de um gene autossômico, sendo mais susceptível a gargalos (*bottlenecks*) (Sperling 2003) e, assim, significativo em estudos de caráter conservacionista.

Na ordem Lepidoptera e em outros *taxa* em que as fêmeas são o sexo heterogamético, o mtDNA possui uma importância maior como marcador genético. Nestes, os efeitos da regra de Haldane significam que as fêmeas são o sexo preferencialmente eliminado em interações híbridas interespecíficas. Portanto, o mtDNA seria desproporcionalmente eliminado em tais interações e esse marcador seria um melhor marcador para se investigar fronteiras entre espécies (Sperling 2003).

Seqüenciamos uma região do mtDNA de 1600 pares de base incluindo a região final 3' da subunidade I do gene da citocromo oxidase (COI), o gene da leucina tRNA e toda a subunidade II do gene da citocromo oxidase (COII) usando a técnica da PCR (Béltran *et al.* 2002). Esse fragmento teve sua identidade confirmada ao ser comparado a seqüências de *Drosophila yakuba* (GenBank X03240) e foi escolhido para o presente estudo por ser uma seqüência menos sujeita a deleções e inserções, o que torna mais fácil fazer o alinhamento de todas as seqüências e de proceder com a análise filogenética (Brower 1996). A região foi amplificada em duas partes usando os *primers* externos (25nm DNA Oligo) C1-J-2183 e TL2-N-3014 para COI e C1-J-2783 e C2-N-3812 para COII (Simon *et al.* 1994). As PCR foram realizadas em *96-well plates*, adicionando-se: 1 µl de *Buffer* de PCR 10X (Tris-HCL

200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), 0,2 µl de dNTP 0,56 mM, 1 µl de MgCl₂ 2 mM, 0,1 µl de Taq DNA polimerase recombinante 10U, 1 µl de DNA 100 ng, 0,4 µl de BSA, 1 µl de *primer* senso e µl de *primer* anti-senso (diluídos em H₂O MilliQ na proporção 1:100) e H₂O MilliQ para um volume final de 10 µl. O programa de termociclagem para amplificação foi conduzido em termociclador (PTC-225 DNA Engine TetradTM Cycler, Bio-Rad[®]), onde inicialmente o DNA foi submetido a 5 ciclos de 48°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Em seguida, houve 30 ciclos de desnaturação-anelamento-extensão com desnaturação realizada a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Posteriormente, as amostras de DNA amplificado foram submetidas à limpeza por ExoSAP (0,5 µl de ExoSAP e 1,5 µl de H₂O milliQ) e preparadas para seqüenciamento. Para tal, foram utilizados seis *primers*, sendo os quatro *primers* externos mencionados anteriormente adicionando-se dois internos: C1-J-2183, C1-J-2441 e TL2-N-3014 para COI e C1-J-2783, C2-J-3297 e C2-N-3812 para COII. Às amostras dispostas em *96-well sequencing plates*, foram adicionados 1,5 µl de Buffer 5x para seqüenciamento, 1,5 µl de BigDye e 3,8 µl do *primer* da região a ser sequenciada. Esse procedimento foi realizado seis vezes com todas as amostras, já que utilizamos seis *primers* diferentes. As amostras foram levadas ao termociclador (37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos). Antes de as amostras serem levadas ao seqüenciador (*16 capillary ABI3130xl Genetic Analyzer*), foi realizada uma limpeza por Sephadex 5%.

Comparative population genetics of mimetic Heliconius butterflies in an endangered habitat; Brazil's Atlantic Forest

Artigo a ser submetido à revista "Molecular Ecology".

Priscila Albuquerque de Moura¹

Swee Peck Quek⁴

Katia Castanho Scortecci³

Márcio Z. Cardoso²

Marcus R. Kronforst⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia, ²Depto. Botânica, Ecologia e Zoologia, ³Depto. Genética, Centro de Biociências, Univ. Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 59072-970, Brazil; ⁴FAS Center for Systems Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

Keywords: population structure, Heliconius, microsatellites, AFLPs, mitochondrial DNA

Correspondence: P. Albuquerque de Moura. E-mail: padm@hawaii.edu.

Running title: Comparative population structure of Heliconius butterflies

Introduction

Landscape structure has a fundamental influence on the distribution of populations, affecting their demography and genetics (Roderick 1996). Some populations may be found continuously distributed while others are patchily distributed across their range, both of which may ultimately lead to some degree of genetic differentiation. Such geographic patterns of genetic variation reflect both historical processes such as natural selection and contemporary gene flow (Fauvelot & Planes 2002).

Gene flow determines the potential for genetic differentiation among populations and for local adaptation and the spread of novel adaptations (Keyghobadi *et al.* 2005). In butterflies, as in other organisms, the nature and extent of gene flow is largely dependent on the mode of reproduction and the mobility of individuals. Species with high vagility may disperse over large distances and therefore have an extensive gene flow over large areas resulting in more homogeneous populations (eg Haag *et al.* 1993; Vandewoestijne *et al.* 1999, Kronforst & Fleming 2001, Krauss *et al.* 2004), whereas in species with low vagility the effect of restricted dispersal will be evident at fine spatial scales (eg Peterson 1996, Williams *et al.* 2003). Furthermore, gene flow may also be affected by a variety of ecological factors such as mating habits, gender-biased dispersal, diet specialisation, habitat and population persistence, and environmental factors (Scribner *et al.* 2005) and geographic distance (Ricklefs 2003).

Extensive studies using molecular markers on butterflies have shown how a highly fragmented landscape may result in the reduction of gene flow among patches of habitat and, consequently, increase genetic differentiation among populations (Keyghobadi *et al.*

1999, 2005, Lushai *et al.* 2000, Clarke & O'Dwyer 2000). Intra- and interpopulational genetic variability is generally more affected in small patches of habitat and in small populations (*Polyommatus coridon*, Schmitt & Seitz 2002, Krauss *et al.* 2004). Even species with high vagility may exhibit susceptibility to fragmentation (Williams *et al.* 2003, Vandewoestijne *et al.* 1999), which leads to higher differentiation as a consequence of lower gene flow between populations.

However, even though information on the relationship between fragmentation and genetic diversity in butterflies is available, many of these studies have been conducted in temperate environments (Debinski 1994, Keyghobadi *et al.* 1999, Krauss *et al.* 2004, Vandewoestijne *et al.* 2004). To date, few such studies have been conducted in the Americas, particularly in the Brazil's Atlantic Forest – a highly fragmented biome considered as a hotspot of biodiversity, a priority area for conservation (Myers *et al.* 2000). The Atlantic Forest has an extremely diverse and unique mix of vegetation and forest types, and is home for thousands of endemic vegetal and animal species. Beginning with sugarcane plantations and later, coffee plantations, this region has been losing habitat for the last five hundreds of years. Today, with the increased expansion of urban areas, the Atlantic Forest is facing severe pressure from the issues tied to urbanization.

Heliconius butterflies are well studied tropical organisms (e.g. Gilbert 1972, 1991, Brown *et al.* 1974, Mallet 1986a, 1986b, Brower 1996, Beltrán *et al.* 2002, Kapan *et al.* 2006, Kronforst *et al.* 2006a, 2006b, Cardoso & Gilbert 2007, Arias *et al.* 2008). They are conspicuous species commonly found in tropical and subtropical secondary forests of the New World (Brown *et al.* 1974). Mark-recapture studies on *Heliconius* have shown that populations remain fairly stable over time, usually at low densities (Gilbert 1991). After a

brief period of dispersal, *Heliconius* adult individuals establish themselves in areas where they remain for the rest of their lives (Mallet 1986b). Thus, populations of *Heliconius* are organised in moderately sedentary units, with little movement of individuals, apparently as a result of home range behaviour (Saafeld & Araújo 1981, Mallet 1986b, Ramos 1999). These behaviours suggest that gene flow among geographically separate populations may be low.

Heliconius erato and *H. melpomene* are distantly related species belonging to two different clades within Heliconius genus. These two co-mimetic species exhibit mimetic convergence throughout their sympatric distribution in Central and South Americas, and they have undergone mimetic divergence, in parallel, into approximately 30 wing phenotypes (Brown et al. 1974). Mimicry evolution in *Heliconius* has been explained by two major hypotheses: the 'Pleistocene rainforest refugia' (Brown et al. 1974) and 'mimetic advergence' (Eltringham 1916) hypotheses. Several lines of evidence point that the latter hypothesis is the most appropriate to explain mimicry evolution in *Heliconius* (see Kronforst & Gilbert 2008 for details). The mimetic advergence hypothesis predicts that the *H. erato* clade radiated first, establishing the diversity of mimetic wing patterns, and subsequently the *H. melpomene* clade radiated and matched the protected mimetic patterns established by the first clade (Flanagan et al. 2004). Striking population subdivision and pronounced genetic drift within *H. erato* clade when compared to *H. melpomene* clade is one of the evidences that *H. erato* is genetically more prone to diversify first and create new mimetic patterns (Kronforst & Gilbert 2008). However, such findings need to be tested in Heliconius specimens found in locations other than Central and northern South Americas.

In spite of the variety of studies on *Heliconius*, little is known about its geographical structure and the effects of fragmentation on the connectivity of populations and the effects of the population structure on the dynamics of mimicry evolution. Most of the studies employ mark-recapture methods to infer population structure (Saafeld & Araújo 1981, Mallet 1986b, Ramos 1999), which may not be reliable to estimate rates of dispersal and genetic differentiation among small and remote populations. Studies with molecular markers on Heliconius are still inconclusive. Kronforst & Fleming (2001) analysed the population genetic structure of highly vagile Heliconius charithonia using allozymes and found low genetic diversity and no evidence of genetic subdivision. Additional studies employing allozymes have shown no evidence of genetic differentiation for other Heliconius species (Turner et al. 1979, Silva & Araújo 1994, Jiggins et al. 1997). However, Kronforst & Gilbert (2008) have found genetic differentiation among populations of six different species of *Heliconius* in Costa Rica using AFLPs. Therefore, the question remains not fully answered; additionally, fragmentation is a big issue that has not been yet entirely addressed in studies on Heliconius.

We had two motivations for this study. Firstly, we wanted to compare the population structure of *Heliconius erato* and *Heliconius melpomene* given the highly fragmented Atlantic Forest habitat. Secondly, studying population structure of co-mimics could give us insights into the dynamics of mimicry evolution. In this study we analysed the spatial structure and connectivity of populations of *Heliconius* butterflies in a highly fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest using microsatellites, AFLPs and mitochondrial DNA as molecular markers. Particularly, we analysed whether populations of *H. erato* and *H. melpomene* are genetically structured throughout the studied fragments. For this, we

estimated patterns of gene flow, genetic differentiation (F_{ST}) and the degree of isolation by distance (IBD) among populations of each species. Also, we inferred maternal gene flow in order to search for evidences of phylogeographic patterns within the *Heliconius* genus.

Materials and methods

Sample collection

Between January 2007 and January 2008, we collected *Heliconius erato* and *Heliconius melpomene* adult specimens from various populations throughout the State of Rio Grande do Norte, Northeastrn Brazil (Fig. 1). Our data consisted of 136 *H. erato* from 8 locations and 146 *H. melpomene* from 7 locations, with distance between sites ranging from 3 to 314 km. Seven sites were remnant patches of coastal Atlantic Forest and one in a cooler habitat island 645 m above sea level in the semi arid Caatinga scrub (Table 1).

Butterflies were transported live to the laboratory, where they were frozen and stored at -80 ^oC until processing for molecular analysis. Total genomic DNA was extracted from one-third of the abdomen of each butterfly using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Microsatellite analysis

We performed an initial screen of fourteen microsatellite loci: nine (Hel02, Hel04, Hel05, Hel08, Hel10-13, Hel15) described by Flanagan *et al.* (2002), three (Hm06, Hm08, Hm16) described by Jiggins *et al.* (2005), one (He-Ca-001) described by Tobler *et al.* (2005) and one (Hm22) described by Mavárez & González (2006). Loci Hel02, Hel10, Hel12, Hel13 and Hm06 were tested only in *H. melpomene* samples, Hel04, Hel08, Hel15, Hm08, Hm16,

Hm22 and He-Ca-001 only in *H. erato*, while Hel05, Hel11 were screened in both species. The primers with best amplification (Hel02, Hel05, Hel08, Hel10-13, Hm16, and Hm22) were selected (see Table 2 for details).

Amplifications were performed in a 10 µL reaction volume containing at least 100 ng of genomic DNA template, 25Nm tailed-forward primer and 25Nm universal end-labelled primer, 12.5Nm reverse primer, 0.56 mM dNTP, 10U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 10 x PCR buffer (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl) and MilliQ water. Loci were amplified by PCR using a PTC-225 DNA Engine Tetrad Cycler, Bio-Rad. The cycling conditions for all loci began with an initial 6 min denaturation at 96°C followed by 30 cycles of 20s denaturation at 92°C, 30 s at an optimum annealing temperature for each primer pair, and 30 s extension at 72°C, and concluded with a 20 min final extension at 72°C. Annealing temperatures are listed in Table 2. Fluorescent-labelled PCR products were separated by an ABI3730x1 Genetic Analyser and sized and scored using ABI GeneMapper software v. 3.7.

We identified allele peak profiles at each locus and assigned each individual a genotype, with alleles designated by their size in base pairs. For each locus at each site, genotypic frequencies were tested for conformity to Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies and the number of alleles per population per locus (A), expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O), and the number of polymorphic loci were calculated according to Nei (1986) and carried out using ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Gene diversity was calculated and AMOVA-based (Excofier *et al.* 1992) pairwise fixation index (F_{ST}) was estimated using ARLEQUIN 3.0. Mantel tests, also implemented with ARLEQUIN

3.0, were used to test each species for isolation by distance (IBD), or a correlation between pairwise genetic and straight-line geographical distances (Hutchinson & Templeton 1999). Genetic clustering was inferred using STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000).

AFLPs analysis

We genotyped each individual with amplified fragment length polymorphisms using the PE Applied Biosystems AFLP plant mapping kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA.) and we separated fragments with an ABI3730xl Genetic Analyser, according to Kronforst & Gilbert (2008). Three selective primer combinations were used to generate fragments; EcoRI-ACT/MseI-CAT, EcoRIACT/MseI-CTG and EcoRI-ACA/MseI-CTG. We sized and scored AFLP fragments using ABI GeneMapper[®] software v. 3.7. Genotype frequencies were tested for conformity to Hardy-Weinberg equilibrium. The number of polymorphic loci was calculated according to Nei (1986) and carried out using ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Gene diversity was calculated and AMOVA-based pairwise fixation index (F_{ST}) was estimated using ARLEQUIN 3.0. Mantel tests, also implemented with ARLEQUIN 3.0, were used to test each species for isolation by distance (IBD), or a correlation between pairwise genetic and straight-line geographical distances (Hutchinson & Templeton 1999). Genetic clustering was inferred using STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000).

Mitochondrial DNA analysis

An approximately 1600 bp region of the mitochondrial DNA, spanning the 3' end of COI, leucine tRNA, and COII was amplified from all individuals genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR). This region was amplified in two parts using primers C1-J-2183 and TL2-N-3014 for COI and C1-J-2783 and C2-N-3812 for COII (Béltran *et al.*

2002). Amplifications were performed in a 10 μ L final reaction volume containing 100 ng of genomic DNA template, 25nM forward primer, 25nm reverse primer, 0.56 mM dNTP, 10U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 10 x PCR buffer (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), BSA and MilliQ water. Sequences were amplified by PCR using a PTC-225 DNA Engine Tetrad Cycler, Bio-Rad. The cycling conditions began with 5 cycles of 45 s at 48°C and 4 cycles of 1 min at 72°C, 30 cycles of 45 s denaturation at 94°C, 45 s annealing at 52° C, and 1 min extension at 72° C, and concluded with a 4 min final extension at 72° C. The PCR products were cleaned using ExoSAP (USB Copr.) and then sequenced using the four external primers and two internal primers: C1-J-2441 for COI and C2-J-3297 for COII. The 8.8- μ l cycle sequence reaction mixture contained 2 μ l purified DNA template, 1.5 μ l sequence buffer 5X, 1.5 µl BigDye and 3.8 µl primer. The cycle profile was 37°C for 15 min and 80°C for 15 min. Products were cleaned with Sephadex 5% then sequenced by an ABI3730xl Genetic Analyser. Sequences were edited and base called using BIOEDIT (Hall 1999) and SEQUENCHER 3.1 (Gene Codes Corporation, Inc.). Following the verification of each sequence for an individual, sequences were aligned in BIOEDIT.

AMOVA-based pairwise F_{ST} was estimated using ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Mantel tests, implemented in ARLEQUIN 3.0, were used to test each species for isolation by distance (IBD). Haplotype networks within species were constructed using TCS (Clements *et al.* 2000), neighbour-joining trees were constructed with MEGA (Tamura *et al.* 2007).

Results

Differentiation among populations

Based on microsatellites and AFLP data *Heliconius melpomene* exhibited more genetic differentiation than *Heliconius erato* (Tables 3, 4 and 5), even though the F_{ST} value for *H. erato* was not significant for microsatellites data. However, for mitochondrial DNA, *H. erato* populations showed more genetic differentiation than *H. melpomene* (Table 3). Also, we found no isolation by distance effect among populations of any of the two species with any of the molecular markers used (Table 3).

Population structure analyses with STRUCTURE shows that all eight *H. erato* populations are genetically grouped as one population only. For microsatellites, highest likelihood values are around -4132.1 (for K=1) while for K=2 to K=10, likelihood values vary from -4796.8 to -4216.8 with no structuring, i.e. genetic variation is distributed equally throughout all individuals from all populations. For AFLP, highest likelihood values are around -60734.9 while for K=2 to K=10, likelihood values vary from -83272.5 to -60651.5 (-60734.9 was chosen over -60651.5 since for the latter value, there was no structuring). All seven *H. melpomene* populations are grouped as three distinct genetic populations. For microsatellites, highest likelihood values are around -1441.3 (for K=3) while for other K values, likelihood values vary from -1698.2 to -1424.7 (-1441.3 was chosen over -1424.7 since for the latter value, there was no structuring). For AFLP, highest likelihood values are around -19993.9 (K=3) while for other K values, likelihood values vary from -56678.4 to -19334.6 (also, for this value there was no structuring).

Heliconius melpomene showed the lowest haplotypic diversity and the less variable nucleotide diversity. Fifteen unique mtDNA haplotypes were identified in *H. melpomene*, with 15 polymorphic sites, among which 11 were singleton, and 4 parsimony informative sites. Mean pairwise sequence divergence among haplotypes was 0.2. Twenty-seven unique mtDNA haplotypes were identified in *H. erato* with 65 polymorphic sites, being 27 singleton, and including 38 parsimony informative sites. Mean pairwise sequence divergence among haplotypes were sites. Mean pairwise sequence divergence among haplotypes with 65 polymorphic sites, being 27 singleton, and including 38 parsimony informative sites. Mean pairwise sequence divergence among haplotypes was 1.2%.

Unrooted parsimony networks of haplotypes (Fig 2) show that 64% of the *H. melpomene* individuals sampled from all populations share the same haplotype. The other four most common haplotypes are shared by 11%, 8.3%, 7.6% and 1.4% of the individuals, respectively, whereas all other individuals had unique haplotypes. For *H. erato*, we observed two unlinked networks. The most representative network show that 49% of the *H. erato* individuals sampled, especially from CTL, CTR, JND and JQ populations, share the same haplotype. Two haplotypes were not linked to any of the two networks. Most of the individuals with unique haplotypes of both species are from the CTR population. Forty percent of *H. erato* and 19% of *H. melpomene* sampled from CTR have unique haplotypes, which might mean that this population is a source of new haplotypes.

We constructed neighbour-joining haplotype trees (Fig 3) for each species. Inspection of the trees reveals only one group in the *H. melpomene*. This is consistent with the lack of population structure from the F_{ST} analysis of mtDNA. Also, for *H. erato*, haplotypes from all populations are grouped into two different clusters. However, three haplotypes (E3, E10)

and E18) which were present in each of three populations (PP, FNL, CTL, respectively) could not be classified into any of the two groups.

Discussion

Population subdivision and local genetic drift are still an incognita in *Heliconius* butterflies system. Kronforst & Gilbert (2008) found striking population subdivision in *H. erato* and *H. melpomene* populations from Costa Rica, especially in *H. erato*, using AFLP as molecular markers. Our initial expectations were that the populations studied here would present the same pattern once (a) *Heliconius* individuals are moderately sedentary, (b) high fragmentation in Brazil's Atlantic Forest disconnects habitats patches, and (c) the more distant population, Martins, would be different from all other populations.

In the present study, we found a different pattern. Over the geographical range from which we collected the specimens, overall differences among populations of *H. erato* were significant yet little when based on AFLP markers. For mitochondrial DNA, this subdivision was striking. In *H. melpomene* populations, we found overall population subdivision based on microsatellites and AFLP only. The first was little yet significant and the latter was striking and even comparable to the population subdivision found by Kronforst & Gilbert (2008) among the Costa Rican populations.

Significant pairwise F_{STS} estimates as high as 0.05, 0.18 and 0.11 (microsatellites, AFLP and mitochondrial DNA respectively) were found in *H. melpomene*. In *H. erato*, such estimates were as high as 0.03, 0.05 and 0.58. Studies on population structure based on

microsatellites (Blum 2002) and AFLP (Kronforst & Gilbert 2008) found, respectively, pairwise F_{STS} equivalent to 0.23 and 0.13 in *H. melpomene* in Central America. In *H. erato*, estimates as high as 0.08 and 0.21 were found based on the same markers. Thus, in the present study, population structure based on microsatellites has been shown to be lower than results found in Central America. Data based on AFLP has shown to be lower in *H. erato* but equivalent in *H. melpomene* when compared to Kronforst & Gilbert (2008).

In Central America, *H. erato* is generally more structured than *H. melpomene*. In our study, we found the opposite pattern; *Heliconius melpomene* is clearly more structured than *H. erato*, except for mtDNA data. First records on the presence of *Heliconius* butterflies in Rio Grande do Norte (Brazil, South America) were published by Brown (1974) but little is known about the colonization history of this genus. In Brazil, *H. erato* is more widespread than its co-mimic, *H. melpomene* (Brown 1974). Indeed, in the studies fragments in Rio Grande do Norte, *H. erato* is more widely distributed than *H. melpomene*. However, *H. melpomene* is more abundant than *H. erato* in three of the other seven fragments. This superiority in abundance, higher levels of genetic variation and genetic structure might indicate the possibility that *H. melpomene* colonised some fragments first than *H. erato*.

In *H. melpomene*, JQ and PP populations were the most differentiated. JQ fragment is one of the largest Atlantic Forest reminiscents in Rio Grande do Norte, whose area comprises 80 ha located next to Pitimbu River. Observations in this fragment have shown that *H. melpomene* is more numerous in the area next to the river while *H. erato* can be easily found in drier areas of the fragment (MZC, personal communication). PP fragment comprises 120 ha of a very fragmented but still humid Atlantic Forest reminiscent located

next to Pipa Beach. For *H. erato*, FLN and JND populations were the most differentiated. FLN is a very humid 108 ha fragment where we found five times more *H. melpomene* specimens than *H. erato*. The small number of *H. erato* samples might be the reason why this population is highly differentiated from others for microsatellites and AFLP markers. The JND fragment from where we collected some specimens comprises 12 ha of a very fragmented forest. We collected more than twice the number of *H. erato* than *H. erato* than *H. melpomene*.

Based on AFLP markers, MRT population, the western and more distant population where we found only *H. erato* specimens, is similar to the southern population, BF. Even if theory predicts that distant populations are genetically differentiated as a result of genetic drift, two populations might be similar simply by chance.

Analysis of mitochondrial DNA variation showed that geographic populations of *Heliconius* in Rio Grande do Norte were not evolutionary distinct. Haplotypes found in *H. erato* are more diverse than in *H. melpomene*, however they are shared almost by all sampled populations. CTR population may be the source of new haplotypes, once most unique haplotypes in both species were sampled in this population. The most probable explanations is that such unique haplotypes may have undergone single base pair mutations – not found in sampled specimens – and may have been passed from CTR to other populations through dispersal of individuals.

Lack of significant pattern of IBD for both species over the studied geographical range may be a combination of two different reasons. Firstly, a very high gene flow among the closest populations may act as a homogeniser factor so that populations function effectively as one large population. Secondly, distant populations may experience low gene flow or may be isolated so that haplotypes frequencies are determined by genetic drift only. Historical anthropomorphic occupancy in Northeastern Brazil throughout the last five hundred years played an important role in the habitat fragmentation of this region. A significant part of the Brazilian Atlantic Forest is highly fragmented with a few continued areas (Silva & Casteleti 2003). The high fragmentation may have changed the landscape qualitatively and quantitatively and, thus, may have been affecting dispersal or migration of *Heliconius* especially among distant fragments. It is unknown how this landscape changing affected dispersal, either proximately or evolutionarily, since we do not have data on the fragmentation history of the fragments we studied or the surrounded landscape.

Our results corroborate to other studies on *Heliconius* butterflies concerning the population subdivision and local genetic drift found in this genus. However, the pattern of this differentiation varies significantly from the pattern found in studies conducted in Central America, where *H. erato* is generally more differentiated and structured than *H. melpomene*, based on nuclear markers. This different pattern may reflect different evolutionary histories of *Heliconius* species in Northeastern Brazilian Atlantic Forest. A better knowledge on geological and forest fragmentation histories in Rio Grande do Norte would be invaluable to better elucidate this pattern.





Site	GPS coordinates	H. erato	H. melpomene
			Ν
JND	5°53'23"S, 35°21'8"W	29	11
FLN	6°4'59"S, 35°11'1"W	5	25
MRT	6°5'5"S, 37°53'59"W	9	0
CTR	5°53'14"S, 35°13'9"W	20	21
CTL	5°54'25"S, 35°14'17"W	25	24
BF	6°24'49"S, 35°4'50"W	7	15
JQ	5°55'33"S, 35°11'42"W	23	23
PP	6°13'23"S, 35°4'14"W	18	26

 Table 1 Species and specimens of *Heliconius* collected in the eight fragments studied in Rio Grande do Norte, Brazil.

Table 2 Microsatellite locus used for *Heliconius erato* and *Heliconius melpomene*specimens collected in the present study.

				T_{c}	(^{o}C)
Locus	Primer sequence (5'-3')	Core repeat	GenBank number	H. erato	H. melpomene
H-102	F: TCAAAATGTTGCAGACCGAG	$(GA)_{13}(GAAA)_2$	A E491467	55	_
Hel02	R: TGCACTTCATTGTAAGGCGT	$(GA)_2$	AF401407	55	-
H-105	F: TGCTGTCCATACCCAACTCA	$(GA)_{14}CA(GA)_4$	A E481470	50	55
пеюз	R: CGAACTCACAACCATCAGTCA		AF401470	52	35
U _109	F: ACATCTCAGAACTGGTCGGC	(CA) ₁₄	AE491472		55
пенов	R: CTCGATCAGCCGGTGATTAT		АГ4014/3	-	55
11-110	F: TCTCACTTTCCCACACAGCA	$(CA)_7 TA(CA)_{10}$	A E401475	55	
Hello	R: TGTGAAGAGACACATGGGGA		AF401473	55	-
Hal11	F: TTTCTTTTGAGTCCCGATGG	(CA) ₁₂	A E491476	55	55
пенн	R: ATCTCAGAACTGGTCGGCAG		АГ481470	55	55
Hal12	F: CGGCACTTCATGTTTCATTT	(TAG) ₄	AF481477	55	
nel12	R: GGCATTTGACTTCAGAATGG			55	-
U al12	F: ATTTCATAGTAACGCCCTCC	(CA) ₁₃	A E481478	55	
ments	R: TGACTTATCGCTAAGGTCAA		AI'401470	55	-
IIm 16	F: CGGATAGACATTTGTTAAAGTGTG	(CA) ₁₄	D0020086	55	55
Hm10	R: ACGAGGATGCGGACTACG		DQ020080	55	35
Hm22	F: CTCGTCCAAACTCCAAAAC	(GA) ₁₆	DO020090		52
пш22	R: AACAATGTCACAACCATCGC		DQ020070	-	52

Table 3 Summary of *H. erato* and *H. melpomene* populations multilocus estimates of F_{ST} and IBD (isolation by distance) values for AFLP, microsatellites and mtDNA generated by 1000 permutations [* P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001, (no asterisk) = not significant].

atu	10115 [1 < 0.05,	1 < 0.01,	(10 usterisk)	- not significa	ntj.	
			F _{ST}	IBD (p)		
		H. erato	H. melpomene	H. erato	H. melpomene	
	AFLP	0.019^{***}	0.086^{***}	0.0414	0.0370	
	msats	0.011	0.020^{**}	0.0778	0.0913	
	mtDNA	0.145^{***}	0.016	0.0077	0.0913	

Table 4 *H. erato* populations pairwise, multilocus estimates of F_{ST} for AFLP are shown below the diagonal, F_{ST} for microsatellites above, both generated by 1000 permutations [* P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001, (no asterisk) = not significant].

Pops	PP	FLN	JQ	JND	CTL	CTR	MRT	BF
PP	0	-0.0095	0.0160	0.0163	0.0104	0.0151	0.0046	-0.0023
FLN	0.0117	0	0.0016	0.0046	0.0070	0.0044	-0.0039	-0.0096
JQ	0.0070^{**}	0.0229^{**}	0	0.0173^{*}	0.0094	0.0154	0.0029	0.0056
JND	0.0150^{***}	0.0270^{*}	0.0166^{***}	0	0.0061	0.0244^{**}	0.0226	-0.0007
CTL	0.0161^{***}	0.0223^{*}	0.0204^{***}	0.0194^{***}	0	0.0154	0.0051	0.0060
CTR	0.0306^{***}	0.0351^{***}	0.0265^{***}	0.0297^{***}	0.0217^{***}	0	0.0083	0.0108
MRT	0.0207^{***}	0.0401^{***}	0.0170^{***}	0.0183^{**}	0.0152^{*}	0.0112^{*}	0	0.0011
BF	0.0206^{**}	0.0536^{***}	0.0144^{**}	0.0185^{*}	0.0149^{*}	0.0138^{*}	0.0022^*	0

Table 5 *H. melpomene* populations pairwise, multilocus estimates of F_{ST} for AFLP are shown below the diagonal, F_{ST} for microsatellites above, both generated by 1000 permutations [* P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001, (no asterisk) = not significant].

1 < 0.01,	< 0.001,	(no usterisk) -	- not significat	nj.			
Pops	PP	FLN	JQ	JND	CTL	CTR	BF
PP	0	0.0195	0.0291^{*}	0.0239	0.0334^{*}	0.0317^{*}	0.0217
FLN	0.0395^{***}	0	0.0245^{*}	0.0093	0.0248^{*}	-0.0015	0.0090
JQ	0.0740^{***}	0.0732^{***}	0	0.0190	0.0139	0.0119	0.0260
JND	0.0457^{***}	0.0828^{***}	0.0348^{**}	0	0.0440^{*}	0.0077	0.0278
CTL	0.0472^{***}	0.0829^{***}	0.0728^{***}	0.0636^{***}	0	0.0312^{*}	0.0183
CTR	0.1060^{***}	0.1164^{***}	0.1218^{***}	0.1374^{***}	0.0458^{***}	0	-0.0060
BF	0.1230^{***}	0.1689^{***}	0.1818^{***}	0.1265^{***}	0.0719^{***}	0.0625^{***}	0

Table 6 Standard diversity indices for all populations of *H. melpomene*, using mitochondrial DNA.

Pop.	п	No. of	No. of unique	No. of poly-	H _s ; average gene
		haplotypes	haplotypes	morphic site	diversity ± DS
PP	26	4	0	3	0.452 ± 0.108
FLN	26	5	0	5	0.637 ± 0.089
JQ	23	6	2	6	0.739 ± 0.061
JND	11	3	0	3	0.345 ± 0.172
CTL	24	5	3	7	0.435 ± 0.119
CTR	21	7	4	8	0.667 ± 0.107
BF	15	5	0	4	0.476 ± 0.154

Table 7	Standard d	liversity indices	for all populations of	<i>H. erato</i> , using mitochondrial DNA.
---------	------------	-------------------	------------------------	--

Pop.	n	No. of haplotypes	No. of unique haplotypes	No. of poly- morphic site	<i>H_s; average gene diversity</i> ± DS
PP	18	8	4	41	0.889 ± 0.041
FLN	5	3	1	40	0.800 ± 0.164
JQ	23	5	1	29	0.502 ± 0.113
JND	29	7	3	35	0.515 ± 0.105
CTL	25	6	2	32	0.533 ± 0.114
CTR	20	10	7	55	0.758 ± 0.101
BF	7	5	2	38	0.905 ± 0.103
MRT	9	4	0	31	0.750 ± 0.112

Heliconius melpomene



Figure 2: Unrooted parsimony networks of haplotypes of two *Heliconius* species: *H. erato* and *H. melpomene* from northeastern Brazil. In each network, ovals represent sampled haplotypes, small circles represent unsampled or extinct haplotypes, and lines between haplotypes represent single nucleotide substitutions. Names inside ovals indicate locations from which the haplotype was sampled, and numbers indicate the number of butterflies carrying the haplotype.



Figure 3: Neighbour-joining haplotype consensus trees for *H. melpomene* e *H. erato*. Terminal tree branches are labelled with haplotypes names (only bootstrap support above 95% is shown).

References

Arias, C. F., Muñoz, A. G., Jiggins, C. D., Mavárez, J., Bermingham, E & Linares, M. 2008. A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology* 17:4699-4712.

Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland.

Beltrán, M., Jiggins, C. D., Bull, V., Linares, M., Mallet, J., McMillan, W.O. & Bermingham, E. 2002. *Phylogenetic* Discordance at the Species Boundary: Comparative Gene Genealogies Among Rapidly Radiating *Heliconius* Butterflies. *Molecular Biologic Evolution* 19(12): 2176-2190.

Blum, M, 2002. Neotropical hybrid zone stability and formation. PhD thesis, Duke University, Department of Zoology.

Brower, A. V. Z. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50:195-221.

Brown, K. S., Sheppard, P. M. E Turner, J. R. G. 1974. Quaternary refugia in tropical America: evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society B*. 187:369-378.

Brown Jr., K. S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. Annual Review of Entomology 26:427-456.

Cardoso, M. Z. & Gilbert, L. E. 2007 A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). *Naturwissenschaften* 94:39-47.

Clarke, G. M. & O'Dwyer, C. 2000. Genetic variability and population structure of the endangered golden sun moth, *Synemon plana*. *Biological Conservation* 92:371-381.

Clements, M.; Posada, D. & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene 6 genealogies. Molecular Ecology 9:1657-1659.

Debinski, D. M. 1994. Genetic diversity assessment in a metapopulation of the butterfly *Euphydryas gillettii. Biological Conservation* 70:25-31.

Ehrlich, P. R. & Gilbert, L. E. 1973. Population structure and dynamics of the tropical butterfly *Heliconius ethilla*. *Biotropica*, 5:69-82.

Eltringham, H. 1916. On specific and mimetic relationships in the genus Heliconius. Trans. Entomol. Soc. Lond. 101–148.

Endler, J. A. 1977. *Geographic Variation, Speciation, and clines*. New Jersey: Princeton University Press.

Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479-491.

Excoffier, L. Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Fauvelot, C. & Planes, S. 2002 Understanding origins of present-day genetic structure in marine fish: biologically or historically driven patterns? *Marine Biology* 141: 773-788.

Flanagan, N. S., Blum, M.J., Davison, A., Alamo, M., Albarrán, R., Faulhaber, K., Peterson, E. & McMillan, W.O. 2002. Characterization of microsatellite loci in neotropical *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology Notes* 2(4):398-401.

Flanagan, N. S., Tobler, A., Davison, A., Pybus, O. G., Kapan, D. D., Planas, S., Linares, M., Heckel, D. & McMillan, W. O. 2004. Historical demography of Müllerian mimicry in the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 101(26):9704-9709.

Galindo-Leal, C. & Camara, I. d. G (eds). 2003. *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook (State of the Hotspots).* Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C.

Gilbert, L. E. 1972. Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69(6):1403-1407.

Gilbert, L. E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert, L. E. and Raven, P. H. (eds) *Coevolution of Animals and Plants*, pp. 210-240. University of Texas Press, Austin.

Gilbert, L. E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, G. W. and Benson, W. W. (eds) *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*, pp. 403-427. John Wiley and Sons, New York.

Haag, K. L., de Araújo, A. M. & Zaha, A. 1993. Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae) revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA polymorphism (RFLP). *Biochemical Genetics* 31: 449-460.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, 1999.

Harper, G. L., Maclean, N. & Goulson, D. 2003. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Biology* 12:3349-3357.

Hutchinson, D. W. & Templeton, A. R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53:1989-1914.

Jiggins, C. D., McMillan, W. O., King, P. & Mallet, J. 1997. The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. *Heredity* 79:495-505.

Jiggins, C. D., Mávarez, J., Beltrán, M., McMillan, W. O., Johnston, J. S. & Bermingham, E. 2005. A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171:557-570.

Joron, M. 2005. Polymorphic mimicry, microhabitat use, and sex-specific behaviour. Journal of Evolutionary Biology 18:547-556.

Kapan, D. D. 2001. Three-butterfly system provides a field test of müllerian mimicry. Nature 409:338-340.

Kapan, D. D., Flanagan, N. S., Tobler, A., Papa, R., Reed, R. D., Gonzalez, J. A., Restrepo, M. R., Martinez, L., Maldonado, K., Ritschoff, C., Heckel, D. G. & McMillan, W. O. 2006. Localization of Müllerian mimicry genes on a dense linkage map of *Heliconius erato*. *Genetics* 173:735-757.

Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 1999. Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology* 8: 1481-1495.

Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 2005. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Molecular Ecology* 14: 1897-1909.

Krauss, J., Schmitt, T., Seitz, A., Steffan-Dewenter, I. & Tscharntke, T. 2004. Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the monophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its northern range margin. *Molecular Ecology* 13: 311-320.

Kronforst, M.R. & Fleming, T.H. 2001. Lack of genetic differentiation among widely spaced subpopulations of a butterfly with home range behaviour. *Heredity* 86(2): 243-250.

Kronforst, M.R., Young, L.G., Blume, L.M. & Gilbert, L.E. 2006a. Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. Evolution 60(6): 1254-1268.

Kronforst, M.R., Kapan, D.D. & Gilbert, L.E. 2006b. Parallel genetic architecture of parallel adaptative radiations in mimetic *Heliconius* butterflies. *Genetics* 174: 535-539.

Kronforst, M. R. & Gilbert, L.E. 2008. The population genetics of mimetic diversity in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society* 275:493-500.

Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing, Oxford.

Lushai, G., Fjellsted, W., Marcovitch, O., Aagaard, K., Sherratt, T. N., Allen, J. A. & Maclean, N. 2000. Application of molecular techniques to non-lethal tissue samples of endangered butterfly populations (*Parnassius apollo* L.) in Norway for conservation management. *Biological Conservation* 94:43-50.

Mallet, J. 1986a. Gregarious roosting and home range in *Heliconius* butterflies. *National Geographic Res.* 2:198-215.

Mallet, J. 1986b. Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behaviour: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia* 68: 210-217.

Mallet, J & Barton, N. 1989. Strong natural selection in a warning-color hybrid zone. *Evolution* 43(2): 421-431.

Mallet, J. & Gilbert, L. E. 1995. Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* 55:159-180.

Maurício-da-Silva, L. & Araújo, A. M. 1994. The genetic structure of *Heliconius erato* populations (Lepidoptera; Nymphalidae). *Revista Brasileira de Genética* 17: 19-24.

Mavárez, J., González, M. 2006. A set of microsatellite markers for *Heliconius* melpomene and closely related species. *Molecular Ecology Notes* 6: 20-23.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B . & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Nei, M. 1986. Definition and Estimation of Fixation Indices. Evolution 40(3):643-645.

Peterson, M.A. 1996. Long-distance gene flow in the sedentary butterfly, *Euphilotes enoptes* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Evolution* 50(5): 1990-1999.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Ramos, R. R. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 53(1):11-21.

Ricklefs, R. E. 2003. *A Economia da Natureza* (Quinta Edição). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 325-352.

Saalfeld, K. & Araújo, A. M. 1981. Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). I: demography of a natural population. *Rev. Brasileira de Biologia* 41(4): 855-860.

Scribner, K.T., Blanchong, J.A., Bruggeman, D.J., Epperson, B.K., Lee, C., Pan, Y., Shorey, R.I., Prince, H.H., Winterstein, S.R. & Luukkonen, D.R. 2005. Geographical genetics: conceptual foundations and empirical applications of spatial genetic data in wildlife management. *Journal of wildlife management* 69(4): 1434-1453.

Schmitt, T. & Seitz, A. 2002. Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. *Biological Conservation* 107:291-297.

Sheppard, P. M., J. R. G. Turner, K. S. Brown, W. W. Benson, M. C. Singer. 1985. Genetics and evolution of Müllerian mimicry in *Heliconius* butterflies. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 308:433-613.

Silva, J.M.C. & Casteleti, C.H.M. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. Pp. 43-59. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (Eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook.* CABS & Island Press, Washington.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9:299-306.

Tobler, A., Kapan, D., Flanagan, N. S., Gonzalez, C., Peterson, E., Jiggins, C. D., Johnston, J. S., Heckel, D. G. & McMillan, W. O. 2005. First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94:408-417.

Turner, J. R. G. 1971. Experiments on the demography of tropical butterflies. II. Longevity and home-range behaviour in *Heliconius erato*. *Biotropica*, 3:21-31.

Turner, J. R. G., Johnson, M. S. & Eanes, W. F. 1979. Contrasted modes of evolution in the same genome: allozymes and adaptive change in *Heliconius*. *Proceedings of the National Academy of Science* 76(4):1924-1928.

Vandewoestijne, S., Nève, G. & Baguette, M. 1999. Spatial and temporal population genetic structure of the butterfly *Aglais urticae* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). *Molecular Ecology* 8: 1539-1543.

Vandewoestijne, S., Martin, T., Liégeois, S. & Maguette, M. 2004. Dispersal, landscape occupancy and population structure in the butterfly *Melanargia galathea*. *Basic and Applied Ecology* 5:581-591.

Williams, B.L., Brawn, J.D. & Paige, K.N. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12: 11-20.

Referências Bibliográficas

Arias, C. F., Muñoz, A. G., Joggins, C. D., Mavárez, J., Bermingham, E & Linares, M. 2008. A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology* 17:4699-4712.

Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland.

Begon, M., Towsend, C.R. & Harper, J.L. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems* (Fourth Edition).Blackwell, Malden.

Beltrán, M., Jiggins, C. D., Bull, V., Linares, M., Mallet, J., McMillan, W.O. & Bermingham, E. 2002. *Phylogenetic* Discordance at the Species Boundary: Comparative Gene Genealogies Among Rapidly Radiating *Heliconius* Butterflies. *Molecular Biologic Evolution* 19(12): 2176-2190.

Beltrán, M. Jiggins, C. D., Andrew, V. Z., Bermingham, E. & Mallet, J. 2007. Do pollen feeding and pupal-mating have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 92(2):221-239.

Berry, O., Tocher, M. D. & Sarre, S. D. 2004. Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology* 13:551-561.

Bonnet, E. & van der Peer, Y. 2002. ZT: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Computational & Geographical Statistics* 7:1-12.

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 from the National Academy of Sciences of the USA* 91:6491-6495.

Brower, A. V. Z. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50:195-221.

Brown, K. S., Sheppard, P. M. E Turner, J. R. G. 1974. Quaternary refugia in tropical America: evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society B.* 187:369-378.

Brown, W. M., George, Jr., M. & Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 76:1967-1971.

Brown Jr., K. S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. Annual Review of Entomology 26:427-456.

Bull, V., Beltrán, M., Jiggins, C. D., McMillan, W. O., Bermingham, E. & Mallet, J. 2006. Polyphyly and gene flow between non-sibling *Heliconius* species. *BMC Biology* 4:11.

Cardoso, M. Z. & Gilbert, L. E. 2007 A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). *Naturwissenschaften* 94:39-47.

Cestaro, L. A. 2002. Fragmentos de Florestas Atlânticas no Rio Grande do Norte: relações estruturais florísticas e fitogeográficas. 146p. Departamento de Ecologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Clarke, G. M. & O'Dwyer, C. 2000. Genetic variability and population structure of the endangered golden sun moth, *Synemon plana*. *Biological Conservation* 92:371-381.

Clement, M.; Posada, D. & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene 6 genealogies. Molecular Ecology 9:1657-1659.

Davies, N. & Bermingham, E. 2002. The historical biogeography of two caribbean butterflies (Lepidoptera: Heliconiidae) as inferred from genetic variation at multiple loci. *Evolution* 56(3):573-589.

Debinski, D. M. 1994. Genetic diversity assessment in a metapopulation of the butterfly *Euphydryas gillettii. Biological Conservation* 70:25-31.

Ehrlich, P. R. & Gilbert, L. E. 1973. Population structure and dynamics of the tropical butterfly *Heliconius ethilla*. *Biotropica*, 5:69-82.

Ehrlich, P. R. & Hanski, I. 2004. *On the Wings of Checkerspots: a Model System for Population Biology*. Oxford University Press.

Endler, J. A. 1977. *Geographic Variation, Speciation, and clines*. New Jersey: Princeton University Press.

Epperson, B. K. 2003. *Geographical Genetics: monographs in population biology*. Princeton University Press, Princeton.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Fauvelot, C. & Planes, S. 2002 Understanding origins of present-day genetic structure in marine fish: biologically or historically driven patterns? *Marine Biology* 141: 773-788.

Flanagan, N. S., Blum, M.J., Davison, A., Alamo, M., Albarrán, R., Faulhaber, K., Peterson, E. & McMillan, W.O. 2002. Characterization of microsatellite loci in neotropical *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology Notes* 2(4):398-401.

Flanagan, N. S., Tobler, A., Davison, A., Pybus, O. G., Kapan, D. D., Planas, S., Linares, M., Heckel, D. & McMillan, W. O. 2004. Historical demography of Müllerian mimicry in

the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Science* 101(26):9704-9709.

Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodénès, C. & Kremer, A. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment lenght polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9:1037-1048.

Gilbert, L. E. 1972. Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69(6):1403-1407.

Gilbert, L. E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert, L. E. and Raven, P. H. (eds) *Coevolution of Animals and Plants*, pp. 210-240. University of Texas Press, Austin.

Gilbert, L. E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, G. W. and Benson, W. W. (eds) *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*, pp. 403-427. John Wiley and Sons, New York.

Gilbert, L. E. 2003. Adaptive novelty through introgression in *Heliconius* wing patterns: evidence for a shared genetic "toolbox" from synthethic hybrid zones and a theory of diversification. *In* C. L. Boggs, W. B. Watt, and P. R. Ehrlich, editors. *Butterflies: ecology and evolution taking flight*. The University of Chicago Press, Chicago.

Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L. & Feldman, M. W. 1995. An Evaluation of Genetic Distances for Use with Microsatellite Loci. *Genetics* 139: 463-471.

Grativol, A. D., J. D. Ballou, and R. C. Fleischer. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). Conservation Genetics **2**:1-9.

Haag, K. L., de Araújo, A. M. & Zaha, A. 1993. Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae) revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA polymorphism (RFLP). *Biochemical Genetics* 31: 449-460.

Hanski, I. 1994. A practical model of metapopulation dynamics. *Journal of Animal Ecology* 63:151-162.

Hanski, I., Pöyry, J., Rakkala, T. & Kuussaari, M. 1995. Multiple equilibria in metapopulation dynamics. *Nature* 377:618-621.

Harper, G. L., Maclean, N. & Goulson, D. 2003. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Biology* 12:3349-3357.

Harrison, S. & Hastings, A. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 180-183.

Harper, G.L., Maclean, N. & Goulson, D. 2003. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular ecology* 12:3349-3357.

Hutchinson, D. W. & Templeton, A. R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53:1989-1914.

Imron, Jeffrey, I. B., Hale, P., Degnan, B. M. & Degnan, S. M. 2007. Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Molecular Ecology* 16:289-304.

Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.

Ji, Y.-J., Zhang, D.-X., Hewitt, G. M., Kang, L. & Li, D.-M. 2003. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. *Molecular Ecology Notes* 3:102-104.

Jiggins, C. D., McMillan, W. O., King, P. & Mallet, J. 1997. The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. *Heredity* 79:495-505.

Jiggins, C. D., Mavarez, J., Beltrán, M., McMillan, W. O., Johnston, J. S. & Bermingham, E. 2005. A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171:557-570.

Joron, M. 2005. Polymorphic mimicry, microhabitat use, and sex-specific behaviour. Journal of Evolutionary Biology 18:547-556.

Joron, M., Jiggins, C. D., Papanicolaou, A. & McMillan, W. O. 2006. *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotipic diversity. *Heredity* 97:157-167.

Joron, M., R. Papa, M. Beltrán, N. Chamberlain, J. Mavárez, S. Baxter, M. Abanto, E. Bermingham, S. J. Humphray, J. Rogers, H. Beasley, K. Barlow, R. H. ffrench-Constant, J. Mallet, C. D. Jiggins. 2006. A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in *Heliconius* butterfly. *PLoS Biology* 4:e303.

Kapan, D. D. 2001. Three-butterfly system provides a field test of müllerian mimicry. Nature 409:338-340.

Kapan, D. D., Flanagan, N. S., Tobler, A., Papa, R., Reed, R. D., Gonzalez, J. A., Restrepo, M. R., Martinez, L., Maldonado, K., Ritschoff, C., Heckel, D. G. & McMillan, W. O. 2006. Localization of Müllerian mimicry genes on a dense linkage map of *Heliconius erato*. *Genetics* 173:735-757.

Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 1999. Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology* 8: 1481-1495.

Keyghobadi, N., Roland, J. & Strobeck, C. 2005. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Molecular Ecology* 14: 1897-1909.

Koopman, W.J.M., Li, Y., Coart, E., Weg, W.E.V., Vosman, B., Roldán-Ruiz, I. & Smulders, M.J.M. 2007. Linked vs. Unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *Molecular Ecology* 16:243-256.

Krauss, J., Schmitt, T., Seitz, A., Steffan-Dewenter, I. & Tscharntke, T. 2004. Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the monophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its nothern range margin. *Molecular Ecology* 13: 311-320.

Kronforst, M.R. & Fleming, T.H. 2001. Lack of genetic differentiation among widely spaced subpopulations of a butterfly with home range behaviour. *Heredity* 86(2): 243-250.

Kronforst, M.R., Young, L.G., Blume, L.M. & Gilbert, L.E. 2006a. Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. Evolution 60(6): 1254-1268.

Kronforst, M.R., Kapan, D.D. & Gilbert, L.E. 2006b. Parallel genetic architecture of parallel adaptative radiations in mimetic *Heliconius* butterflies. *Genetics* 174: 535-539.

Kronforst, M. R., Young, L. G., Kapan, D. D., McNeely, C., O'Neill, R. J. & Gilbert, L. E. 2006c. Linkage of butterfly mate preference and win color preference cue at the genomic location of *wingless*. *Proceedings of the National Academy of Science* 103(17):6575-6580.

Kronforst, M. R. 2008. Gene flow persists millions of years after speciation in *Heliconius* butterflies. *BMC Evolutionary Biology* 8:98.

Kronforst, M. R. & Gilbert, L.E. 2008. The population genetics of mimetic diversity in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society* 275:493-500.

Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing, Oxford.

Loxdale, H. D. & Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88:577-600.

Lushai, G., Fjellsted, W., Marcovitch, O., Aagaard, K., Sherratt, T. N., Allen, J. A. & Maclean, N. 2000. Application of molecular techniques to non-lethal tissue samples of endangered butterfly populations (*Parnassius apollo* L.) in Norway for conservation management. *Biological Conservation* 94:43-50.

Mallet, J. 1986a. Gregarious roosting and home range in *Heliconius* butterflies. *National Geographic Res.* 2:198-215.

Mallet, J. 1986b. Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behaviour: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia* 68: 210-217.

Mallet, J. 2001. Gene Flow. In: Wolwod, I. P., D. R. Reynolds and C. D. Thomas. (eds) *Insect Movement: Mechanisms and Consequences*, pp. 337-360. CAB International.

Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20(5):229-237.

Mallet, J & Barton, N. 1989. Strong natural selection in a warning-color hybrid zone. *Evolution* 43(2): 421-431.

Mallet, J., Barton, N., Lamas, G., Santisbeban, J., Muedas, M. & Eeley, H. 1990. Estimates of selection and gene flow from measures of cline width and linkage disequilibrium in *Heliconius* hybrid zones. *Genetics* 124: 921-936.

Mallet, J. & Gilbert, L. E. 1995. Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* 55:159-180.

Mallet, J. & Joron, M. 1999. Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annu. Rev. Eco. Syst.* 30:201-233.

Mallet, J., Jiggins, C.D. & McMillan, W.O. 1996. Evolution: mimicry meets the mitochondrion. 1996. *Current Biology* 6(8): 937-940.

Mavárez, J., González, M. 2006. A set of microsatellite markers for *Heliconius* melpomene and closely related species. *Molecular Ecology Notes* 6: 20-23.

Mueller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14:389-394.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Naisbit, E. R., Jiggins, C. D. & Mallet, J. 2003. Mimicry: developmental genes that contribute to speciation. *Evolution & Development* 5(3): 269-280.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

Neigel, J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:105-128.

Papanicolaou, A., Joron, M., McMillan, W. O., Blaxter, M. L. & Jiggins, C. D. Genomic tools and cDNA derived markers for butterflies. *Molecular Ecology* 14:2883-2897.

Peterson, M.A. 1996. Long-distance gene flow in the sedentary butterfliy, *Euphilotes enoptes* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Evolution* 50(5): 1990-1999.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Ramos, R. R. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 53(1):11-21.

Reed, R. D., & L. E. Gilbert. 2004. Wing venation and Distal-less expression in *Heliconius* butterfly wing pattern development. *Development Genes and Evolution* 214:628-634.

Ricklefs, R. E. 2003. *A Economia da Natureza* (Quinta Edição). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 325-352.

Rowe, G. & Beebee, J. C. 2007. Defining population boundaries: use of three Bayesian approaches with microsatellite data from British natterjack toads (*Bufo calamita*). *Molecular Ecology* 16:785-796.

Saalfeld, K. & Araújo, A. M. 1981. Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). I: demography of a natural population. *Rev. Brasileira de Biologia* 41(4): 855-860.

Salazar, C., Jiggins, C. D., Taylor, J. E., Kronforst, M. R. & Linares, M. 2008. Gene flow and the genealogical history of *Heliconius heurippa*. *BMC Evolutionary Biology* 8:132.

Schmitt, T. & Hewitt, G.M. 2004. The genetic pattern of population threat and loss: a case of study of butterflies. *Molecular Ecology* 13: 21-31.

Schmitt, T. & Seitz, A. 2002. Influence of habitat fragmentation on the genetic structure of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): implications for conservation. *Biological Conservation* 107:291-297.

Schneider, J. C. 1999 Dispersal of a highly vagile insect in a heterogeneous environment. *Ecology* 80(8):2740-2749.
Scribner, K.T., Blanchong, J.A., Bruggeman, D.J., Epperson, B.K., Lee, C., Pan, Y., Shorey, R.I., Prince, H.H., Winterstein, S.R. & Luukkonen, D.R. 2005. Geographical genetics: conceptual foundations and empirical applications of spatial genetic data in wildlife management. *Journal of wildlife management* 69(4): 1434-1453.

Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.

Sheppard, P. M., J. R. G. Turner, K. S. Brown, W. W. Benson, M. C. Singer. 1985. Genetics and evolution of Müllerian mimicry in *Heliconius* butterflies. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 308:433-613.

Silva, J.M.C. & Casteleti, C.H.M. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. Pp. 43-59. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (Eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook.* CABS & Island Press, Washington.

Simon, C., Fratti, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomology Society of America* 87:651-701.

Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236(4803): 787-792.

Sperling, F. 2003. Butterfly molecular systematics: from species definitions to higher-level phyogenies. In: Boggs, C.L., W. B. Watt and P. R. Ehrlich. (eds) *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*, pp. 431-458. University of Chicago Press.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Tobler, A., Kapan, D., Flanagan, N. S., Gonzalez, C., Peterson, E., Jiggins, C. D., Johnston, J. S., Heckel, D. G. & McMillan, W. O. 2005. First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94:408-417.

Turner, J. R. G. 1971. Experiments on the demography of tropical butterflies. II. Longevity and home-range behaviour in *Heliconius erato*. *Biotropica*, 3:21-31.

Turner, J. R. G., Johnson, M. S. & Eanes, W. F. 1979. Contrasted modes of evolution in the same genome: allozymes and adaptive change in *Heliconius*. *Proceedings of the National Academy of Science* 76(4):1924-1928.

Underwood, J. N., Smith, L. D., Oppen, J. H. & Gilmour, J. P. 2007. Multiple scales of genetic connectivity in a brooding coral on isolated reefs following catastrophic bleaching. *Molecular Biology* 16:771-784.

Vandewoestijne, S., Nève, G. & Baguette, M. 1999. Spatial and temporal population genetic structure of the butterfly *Aglais urticae* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). *Molecular Ecology* 8: 1539-1543.

Vandewoestijne, S., Martin, T., Liégeois, S. & Maguette, M. 2004. Dispersal, landscape occupancy and population structure in the butterfly *Melanargia galathea*. *Basic and Applied Ecology* 5:581-591.

Vawter, L. & Brown, W. M. 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234:194-196.

Williams, B.L., Brawn, J.D. & Paige, K.N. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12: 11-20.

Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.

Zhang, D-X. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution* 19(10):507-509.

Zhivotovsky, L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8:907-913.

Anexos

Anexo I – Caracterização dos fragmentos de floresta Atlântica usados neste estudo.

Escola Agrícola de Jundiaí (JND)

A Escola Agrícola de Jundiaí (5°53'23"S, 35°21'8"W) localiza-se no Município de Macaíba, a 19 km de Natal. Possui uma área total de 270 ha, mas sua área de Mata Atlântica constitui menos de 70% de sua área distribuídas em pequenos fragmentos. Existem dois tipos de vegetação na área: uma mais rasteira e seca, que domina a área, e outra mais úmida e densa, confinada a áreas mais próximas a uma lagoa artificial existente na área. As coletas nesta área foram realizadas no fragmento maior e mais úmido, que possui cerca de 10 ha. Existe um histórico de ocupação na EAJ por pequenos agricultores, que têm desmatado parte da área próxima à lagoa para fins de agricultura de subsistência. A Escola em si foi criada em dezembro de 1949.

Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLN)

A FLONA de Nísia Floresta (6°4'59"S, 35°11'1"W) localiza-se no Município de Nísia Floresta, a 32 km de Natal. Possui uma área total de 179,96 ha, sendo 40% de plantio experimental e 60% de Mata Atlântica. A vegetação é predominantemente de floresta subperenifólia, densa e úmida, com solo recoberto por uma camada de húmus.

Martins (MRT)

O Município de Martins (6°5'5"S, 37°53'59"W) localiza-se sobre uma serra a 300 km de Natal. Possui formação vegetação de caatinga hiperxerófila, com vegetação de caráter mais seco, com abundância de cactáceas e plantas de porte mais baixo e espalhadas.

Mata do Catre

A Mata do Catre localiza-se na Base Aérea de Natal, no Município de Parnamirim, a 13 km de Natal. Possui uma área total de 215 ha, com uma vegetação predominantemente úmida e densa, sendo dividida em duas áreas principais: uma próxima ao Rio Pitimbu (CTR, 5°53'14"S, 35°13'9"W) e outra próxima a uma lagoa (CTL, 5°54'25"S, 35°14'17"W). Esta área foi utilizada pela Aeronáutica pela primeira vez em 1942, quando a Base Aérea foi estabelecida.

Mata do Dançarino (BF)

A Mata do Dançarino (6°24'49"S, 35°4'50"W) localiza-se no Município de Baía Formosa, a cerca de 70 km de Natal e possui cerca de 280 ha. A vegetação é predominantemente de floresta subperenifólia, densa e úmida, com solo recoberto por uma camada de húmus.

Mata do Jiqui (JQ)

A Mata do Jiqui localiza-se na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Norte (EMPARN) (5°55'33"S, 35°11'42"W), a 14,6 km de Natal, sendo um dos poucos remanescentes florestais representativos na região de Natal (Cestaro 2002). A mata consiste em um mosaico de mata semidecídua, cercada por áreas de agricultura experimental, com plantações de cajueiros e coqueiros. A área correspondente ao local onde foram realizadas as coletas do presente concentra as porções mais conservadas da mata. A mata do Jiqui apresenta ambientes de borda extremamente ensolarados e quentes. As partes mais altas do terreno (setor NW, 51 m a.n.m.) ficam gradativamente mais secas ao longo do período mais seco (verão). As partes mais baixas (setor SE, 7 m a.n.m.), próximas ao rio Pitimbu, apresentam solos mais úmidos, alagáveis no inverno e com solos menos secos no verão. O solo é caracteristicamente arenoso, com um perfil de litter fino, mais acentuado nas áreas mais fechadas da floresta (Cestaro 2002). As coletas foram realizadas ao longo de toda a área da mata, especialmente em áreas onde foi observada uma maior densidade populacional de *Heliconius*.

Santuário Ecológico de Pipa (PP)

O Santuário Ecológico de Pipa (6°13'23"S, 35°4'14"W) localiza-se no Município de Tibau do Sul, a 50 km de Natal em uma área de 120 ha de mata. A formação florestal ocorrente na região de Pipa é a Floresta Subcadacifólia. Até o início da década de 90 esse tipo de floresta, que circundava as áreas de Pipa e Tibau do Sul, formava uma faixa quase contínua. Essa vegetação florestal se apresenta bastante descaracterizada, em razão da perda da cobertura florestal natural.

ID	ID	Espécie	Sexo	Georeferência	
extração	coleta			Latitude	Longitude
PA001	PP01	ERA	М		0
PA002	PP02	ERA	М		
PA003	PP03	ERA	М		
PA004	PP04	ERA	F		
PA005	PP05	ERA	М		
PA006	PP06	ERA	F		
PA007	PP07	ERA	М		
PA008	PP08	MEL	F		
PA009	PP09	ERA	F		
PA010	PP10	ERA	F		
PA011	PP11	ERA	М		
PA012	PP12	ERA	М		
PA013	PP13	ERA	М		
PA014	PP14	ERA	F		
PA015	PP15	ERA	F		
PA016	PP16	ERA	F		
PA017	PP17	ERA	F		
PA018	PP29	ERA	F	06°13'24S	35°04'04W
PA019	PP43	ERA	F	06°13'37S	35°03'51W
PA020	FLN24	ERA	F	06°04'59S	35°11'01W
PA021	FLN25	ERA	F	06°04'59S	35°11'01W
PA022	FLN26	ERA	M	06°04'59S	35°11'01W
PA023	FLN27	ERA	F	06°05'08S	35°11'07W
PA024	FLN31	ERA	F	06°04'59S	35°11'02W
PA025	JO01	ERA	M	00 01000	00 11 02 0
PA026	JO02	ERA	M		
PA027	JO03	ERA	M		
PA028	1004	ERA	Μ		
PA029	JO05	ERA	M		
PA030	1006	ERA	Μ		
PA031	JO07	ERA	Μ		
PA032	JO08	ERA	M		
PA033	JO09	ERA	Μ		
PA034	JO10	ERA	Μ		
PA035	JO11	ERA	Μ		
PA036	JO12	ERA	М		
PA037	JO13	ERA	М		
PA038	JO14	ERA	F		
PA039	JO15	ERA	F		
PA040	JO16	ERA	F		
PA041	JO17	ERA	F		
PA042	JO18	ERA	F		
PA043	JO19	ERA	M		
PA044	JO20	ERA	Μ		
PA045	JO21	ERA	Μ		
PA046	JO42	ERA	F	05°55'43S	35°10'52W
PA047	JO43	ERA	F	05°55'43S	35°10'52W
PA048	JND01	ERA	F		
PA049	JND02	ERA	M		
PA050	JND03	ERA	M		
PA051	JND04	ERA	Μ		

Anexo II - Lista de indivíduos coletados nos oito fragmentos estudados.

PA052	JND05	ERA	Μ		
PA053	JND06	ERA	F		
PA054	JND07	ERA	F		
PA055	JND08	ERA	F		
PA056	IND09	ERA	M		
PA057	IND10	ERA	F		
DA058	IND11	ER A	F		
DA050	IND12		M		
DA060	JND12 IND13		M		
PA000	JND15		M		
PA001	JND14		IVI M		
PA062	JND15	EKA	M		
PA063	JND16	ERA	M		
PA064	JND17	ERA	M		
PA065	JND18	ERA	Μ		
PA066	JND19	ERA	F		
PA067	JND20	ERA	F		
PA068	JND21	ERA	Μ		
PA069	JND22	ERA	Μ	F	
PA070	JND23	ERA	F	05°53'28S	35°21'12W
PA071	JND24	ERA	Μ	05°53'30S	35°21'12W
PA072	JND25	ERA	Μ	05°53'30S	35°21'12W
PA073	JND26	ERA	F	05°53'29S	35°21'12W
PA074	JND27	ERA	Μ	05°53'28S	35°21'12W
PA075	JND28	ERA	Μ	05°53'23S	35°21'08W
PA076	JND37	ERA	М	05°53'24S	35°21'09W
PA077	CTL01	ERA	М		
PA078	CTL02	ERA	F		
PA079	CTL03	ERA	M		
PA080	CTL 04	FRA	M		
PA081	CTL 05	FRA	M		
DA082	CTL05	ERA ERA	M		
DA082	CTL00		M		
PA005	CTL07				
DA004	CTL08		I' M		
PA083	CTL09		IVI E		
PA080	CTL10		Г		
PA08/	CILII CTL 12	EKA	F		
PA088	CILI2	ERA	M		
PA089	CTL13	ERA	M		
PA090	CTL14	ERA	F		
PA091	CTL15	ERA	F		
PA092	CTL16	ERA	Μ		
PA093	CTL17	ERA	Μ		
PA094	CTL18	ERA	Μ		
PA095	CTL19	ERA	Μ		
PA096	CTL20	ERA	Μ		
PA097	CTL36	ERA	Μ	05°54'25S	35°14'17W
PA098	CTL37	ERA	Μ	05°54'25S	35°14'16W
PA099	CTL38	ERA	Μ	05°54'23S	35°14'14W
PA100	CTL39	ERA	F	05°54'25S	35°14'17W
PA101	CTL49	ERA	F	05°54'25S	35°14'17W
PA102	CTR01	ERA	F		
PA103	CTR02	ERA	М		
PA104	CTR03	ERA	М		
PA105	CTR04	ERA	F		
PA106	CTR05	ERA	M		
PA107	CTR06	ERA	F		
			-		

PA108	CTR07	ERA	М		
PA109	CTR08	ERA	Μ		
PA110	CTR09	ERA	Μ		
PA111	CTR10	ERA	Μ		
PA112	CTR11	ERA	Μ		
PA113	CTR12	ERA	Μ		
PA114	CTR13	ERA	Μ		
PA115	CTR14	ERA	F		
PA116	CTR15	ERA	М		
PA117	CTR16	ERA	F		
PA118	CTR17	ERA	М		
PA119	CTR18	ERA	М		
PA120	CTR19	ERA	М		
PA121	CTR20	ERA	М		
PA122	MRT01	ERA	F	06°05'04S	37°53'59W
PA123	MRT02	ERA	F	06°05'04S	37°53'59W
PA124	MRT03	ERA	M	06°05'04S	37°53'59W
PA125	MRT04	ERA	M	06°05'04S	37°53'59W
PA126	MRT05	ERA	F	06°05'04S	37°53'59W
PA127	MRT06	FRA	M	06°05'04S	37°53'59W
PA128	MRT07	ERA	M	06°05'04S	37°53'59W
PA120	MRT08	FRA	M	06°05'04S	37°53'59W
PΔ130	MRT00	ERA ERA	F	06°05'04S	37°53'59W
PA131	BF16	ERA FRA	F	06°24'49S	35°04'50W
PA132	BF17	FRA	M	06°24'34S	35°04'36W
PΔ133	BF18	ERA ERA	F	06°24'25S	35°04'22W
PΔ134	BF10	ERA	F	06°24'33S	35°04'37W
DA135	BF20	ERA ERA	M	06°24'335	35°04'30W
DA136	BF21	ERA ERA	M	06°24'335	35°04'37W
PA130	BF21 BF22	ERA ERA	M	06°24'35S	35°04'37 W
DA138	DD122 DD18	MEI	M	00 24 555	55 0 4 28 W
DA130	DD10	MEL	M		
DA140	PP20	MEL	M		
DA141	DD21	MEL	E		
DA141	PP21	MEL	M		
DA142	DD23	MEL	M		
PA145	PP24	MEL	M		
FA144 DA145	PP24	MEL			
PA145	PP26	MEL	Г Б		
DA147	DD27	MEL	M		
DA149	DD28	MEL	E		
DA 140	PP30	MEL	I' M	060131248	35°04'04W
FA149	PP30	MEL	M	06 13 243	35 04 04 W $35^{\circ}04'04 W$
PAIJU DA151	PP31 DD22	MEL	IVI E	00 15 255	35 04 04 W
PAIJI DA152	PP32 DD22	MEL	Г	06 13 245	35 04 04 W $35^{\circ}04'04 W$
PA152		MEL	M	00 15 255	35 04 04 W
PA155	DD25	MEL	M	06°13'245	35 0401 W
FA154		MEL	M	06 13 243	35 04 04 W
PAIJJ DA156	PP30	MEL	IVI M	00 15 245	35 0404W
PA150	PP3/	MEL	M	06°13245	35°04 04 W
PAIS/	PP38	MEL	M	06°13'24S	35°04'04 W
PA158	PP39	MEL	Г М	06°13'245	35°04'04 W
PA159	PP40	MEL	M	06912245	55°05'50W
PA100	PP41	MEL	Г Г	06°12'245	55 04 04 W
PAIOI	PP42	MEL	Г М	069122248	55°04'04W
PA162	PP44	MEL	M	06004/565	55°05'51W
PA163	FLN01	MEL	F	06~04'568	35°11'06W

PA164	FI N02	MEI	F	06°04'56S	35°11'06W
PA165	FLN02	MEL	F	06°04'595	35°11'01W
PA166	FLN03	MEL	F	06°05'005	35°11'02W
DA 167	FLN04	MEL	г Г	06°04'505	35°11'01W
DA 169	FLN05	MEL	L L	06°04'505	$35^{\circ}11'01W$
FA100	FLN00 ELN07	MEL	Г	00 04 393	35 1101 W
PA109	FLN07	MEL	IVI M	00 04 393	35 11 01 W
PA170	FLN08	MEL	M	06°04'595	35°11'01W
PAI/I	FLN09	MEL	M	06°04'59S	35°11'01W
PAT/2	FLN10	MEL	M	06°05'00S	35°11'02W
PA173	FLN11	MEL	Μ	06°04'59S	35°11'01W
PA174	FLN12	MEL	Μ	06°05'00S	35°11'02W
PA175	FLN13	MEL	Μ	06°04'59S	35°11'01W
PA176	FLN14	MEL	Μ	06°04'59S	35°11'01W
PA177	FLN15	MEL	F	06°05'01S	35°11'02W
PA178	FLN16	MEL	Μ	06°04'52S	35°11'00W
PA179	FLN17	MEL	Μ	06°05'02S	35°11'16W
PA180	FLN18	MEL	Μ	06°04'42S	35°11'06W
PA181	FLN19	MEL	Μ	06°05'02S	35°11'16W
PA182	FLN20	MEL	Μ	06°04'42S	35°11'06W
PA183	FLN21	MEL	М	06°04'52S	35°11'00W
PA184	FLN22	MEL	М	06°04'52S	35°11'06W
PA185	FLN23	MEL	M	06°05'00S	35°11'01W
PA186	FLN28	MEL	M	06°04'59S	35°11'02W
PA187	FI N29	MEL	M	06°04'52S	35°11'00W
PA188	FLN30	MEL	M	06°04'52S	35°11'00W
DA 190	1022	MEL	M	00 04 525	55 11 00 W
DA 100	JQ22 1023	MEL	M		
PA190	JQ23	MEL	M		
FA191	JQ24 1025	MEL	IVI M		
PA192	JQ25	MEL	M		
PA193	JQ26	MEL	M		
PA194	JQ27	MEL	M		
PA195	JQ28	MEL	M		
PA196	JQ29	MEL	M		
PA197	JQ30	MEL	Μ		
PA198	JQ31	MEL	Μ		
PA199	JQ32	MEL	Μ		
PA200	JQ33	MEL	Μ		
PA201	JQ34	MEL	Μ		
PA202	JQ35	MEL	Μ		
PA203	JQ36	MEL	Μ		
PA204	JQ37	MEL	Μ		
PA205	JQ38	MEL	Μ		
PA206	JQ39	MEL	Μ		
PA207	JO40	MEL	М		
PA208	JO41	MEL	F		
PA209	JO44	MEL	F	05°55'438	35°10'52W
PA210	1045	MEL	F	05°55'40S	35°10'49W
PA211	IQ46	MEL	F	05°55'34S	35°10'50W
PA212	IND29	MEL	F	00 00 0 10	20 10000
PA212	IND30	MFI	F		
PA213	IND31	MEI	F		
PA214	INID22	MEL	M		
1 A213 DA216	IND32	MEL	E IVI		
FA210 DA217	JND35	MEL	г Б		
PA21/	JIND34	MEL	Г		
PA218	JIND35	MEL	M		
PA219	JND36	MEL	F		

PA220	JND38	MEL	F	05°53'30S	35°21'09W
PA221	IND39	MEL	F	05°53'33S	35°21'13W
PA222	JND40	MEL	M	05°53'23S	35°21'09W
PA223	CTL21	MEL	F		
PA224	CTL22	MEL	F		
PA225	CTL 23	MEL	M		
PA225	CTL25	MEL	M		
DA 227	CTL24	MEL	M		
FA227	CTL25	MEL	IVI M		
PA228	CTL20	MEL			
PA229	CTL27	MEL	Г		
PA230	CIL28	MEL	F		
PA231	CIL29	MEL	F		
PA232	CTL30	MEL	F		
PA233	CTL31	MEL	F		
PA234	CTL32	MEL	Μ		
PA235	CTL33	MEL	F		
PA236	CTL34	MEL	F		
PA237	CTL35	MEL	F		
PA238	CTL40	MEL	F	05°54'25S	35°14'16W
PA239	CTL41	MEL	F	05°54'23S	35°14'14W
PA240	CTL42	MEL	F	05°54'23S	35°14'14W
PA241	CTL43	MEL	F	05°54'25S	35°14'14W
PA242	CTL44	MEL	Μ	05°54'25S	35°14'17W
PA243	CTL45	MEL	Μ	05°54'25S	35°14'17W
PA244	CTL46	MEL	Μ	05°54'25S	35°14'17W
PA245	CTL47	MEL	М	05°54'25S	35°14'16W
PA246	CTL48	MEL	Μ	05°54'25S	35°14'14W
PA247	CTR21	MEL	F		
PA248	CTR22	MEL	F		
PA249	CTR23	MEL	F		
PA250	CTR24	MEL	F		
PA251	CTR25	MEL	F		
PA252	CTR25	MEL	F		
PA252	CTR20	MEL	F		
ΓA255 ΡΛ254	CTR27	MEL	F		
DA 255	CTR20	MEL	M		
FA255	CTR29	MEL	IVI M		
PA230	CTR30	MEL	IVI M		
PA257	CTR31	MEL			
PA258	CTR32	MEL	M		
PA259	CTR33	MEL	F		
PA260	CIR34	MEL	F		
PA261	CTR35	MEL	F		
PA262	CTR36	MEL	F		
PA263	CTR37	MEL	Μ		
PA264	CTR38	MEL	Μ		
PA265	CTR39	MEL	Μ		
PA266	CTR40	MEL	Μ		
PA267	CTR41	MEL	F		
PA268	BF01	MEL	Μ	06°24'49S	35°04'50W
PA269	BF02	MEL	Μ	06°24'49S	35°04'50W
PA270	BF03	MEL	F	06°24'33S	35°04'39W
PA271	BF04	MEL	Μ	06°24'34S	35°04'36W
PA272	BF05	MEL	Μ	06°24'33S	35°04'39W
PA273	BF06	MEL	Μ	06°24'34S	35°04'35W
PA274	BF07	MEL	Μ	06°24'33S	35°04'37W
PA275	BF08	MEL	F	06°24'34S	35°04'37W

PA276	BF09	MEL	Μ	06°24'37S	35°04'26W
PA277	BF10	MEL	Μ	06°24'34S	35°04'35W
PA278	BF11	MEL	Μ	06°24'48S	35°04'49W
PA279	BF12	MEL	Μ	06°24'48S	35°04'50W
PA280	BF13	MEL	Μ	06°24'41S	35°04'28W
PA281	BF14	MEL	F	06°24'33S	35°04'34W
PA282	BF15	MEL	F	06°24'34S	35°04'30W

PA = Priscila Albuquerque; JND = Escola Agrícola de Jundiaí; FLN = Floresta Nacional de Nísia Floresta; MRT = Martins; CTR = Mata do Catre; CTL = Lagoa do Catre; BF = Mata do Dançarino (Baía Formosa); JQ = Mata do Jiquí; PP = Santuário Ecológico de Pipa; M = Macho; F = Fêmea.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo