Lucas Waldvogel Cardoso

Contribuição de marcadores morfológicos e
moleculares na elucidação da Sistemática de
Ambulycini (Lepidoptera, Sphingidae,
Smerinthinae)

Contribution of morphological and molecular
markers to the elucidation of the Ambulycini
systematics (Lepidoptera, Sphingidae,
Smerinthinae)

São Paulo

2015

Exemplar corrigido

O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

Lucas Waldvogel Cardoso

**Contribuição de marcadores morfológicos e
moleculares na elucidação da Sistemática de
Ambulycini (Lepidoptera, Sphingidae,
Smerinthinae)**

**Contribution of morphological and molecular
markers to the elucidation of the Ambulycini
systematics (Lepidoptera, Sphingidae,
Smerinthinae)**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências Biológicas, na
Área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Duarte
da Silva

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Waldvogel Cardoso, Lucas
Contribuição de marcadores
morfológicos e moleculares na
elucidação da Sistemática de
Ambulycini (Lepidoptera,
Sphingidae, Smerinthinae)
187 + iv pp.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Zoologia.

1. Ambulycini 2. Filogenia 3.
Filogeografia 4. Conservação

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedicatória

À minha
família, a quem devo todas
as minhas conquistas.

Epígrafe

“The crux of the problem is that if we don’t know what is out there or how widely species are distributed, how can we convince people about the reality and form of the biodiversity crisis?”

Riddle *et al.* (2011).

Agradecimentos

Inicialmente, ao Prof. Dr. Marcelo Duarte, a quem devo muito pela paciência e compreensão. Agradeço pelas oportunidades concedidas, pela orientação presente, por contribuir para a concretização do meu sonho de ir ao exterior e pelo empenho pessoal empregado no projeto, com a visita a coleções estrangeiras, a obtenção de empréstimos e a aquisição de exemplares importantes para este estudo. Sua dedicação foi de extrema importância para o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço imensamente à Dra. Karina Lucas, que colocou à disposição deste trabalho sua experiência e seu vasto conhecimento na área molecular e em evolução. Sua coorientação teve inestimável valor para os resultados obtidos.

À Dra. Karina Lucas e ao seu marido, Dr. Marcelo Brandão, por terem me recebido tão acolhedoramente em uma de minhas viagens à Piracicaba.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, por ter viabilizado financeiramente a enriquecedora oportunidade de visitar o National Museum of Natural History. Ao Smithsonian Institution, em especial, aos Drs. John Brown e Robert Robbins, pela atenção e solicitude durante todo o período da visita técnica, me permitindo passar ótimos e importantes momentos em Washington, DC.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos nº 2002/13898-0 e 2011/50225-3), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo nº 563332/2010-7 - SISBIOTA/ Rede Nacional de Pesquisa e Conservação de Lepidópteros) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo custeio das viagens de coleta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro, imprescindível à produção do presente trabalho.

Ao Dr. Carlos Mielke, pela gentileza de doar ovos de *Orecta lycidas*, que, por fim, viraram um dos capítulos dessa dissertação.

Ao Dr. Jean Haxaire, pela doação de dois exemplares de Ambulycini, um deles fundamental para que todos os gêneros fossem estudados.

Ao Alexandre Soares, técnico da coleção de Lepidoptera do Museu Nacional do Rio de Janeiro, por atenciosamente me ajudar com a consulta dos Sphingidae dessa coleção, poupando-me a necessidade de uma visita presencial, e pelo cuidado com o envio de exemplares.

Ao grupo de Bioinformática Aplicada e Biologia Computacional (Dr. Marcelo Mendes Brandão), pelo uso do Thunder Cluster, custeado pela FAPESP (processo nº 2011/00417-3).

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ESALQ-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, por amigavelmente me permitir o uso da infraestrutura durante o meu aprendizado das técnicas moleculares. À equipe que me recebeu carinhosamente e através de conversas e risadas me proporcionaram ótimos momentos. Em especial à Poliene, que pacientemente atendeu a todas as minhas dúvidas.

À República Xana Boiadeira, pela recepção fraternal em muitas de minhas idas à Piracicaba. Em especial ao Tistino (André), por quem guardo grande consideração.

À técnica Dra. Jaqueline Battilana, por seus préstimos e sua disposição, me ajudou mesmo nos dias de greve, e a todos os funcionários do Museu de Zoologia da USP que participaram diretamente da realização deste trabalho.

A todos os queridos do Laboratório de Sistemática de Lepidoptera, colegas e amigos com os quais tive a alegria de compartilhar cada momento deste processo. À Dra. Livia Pinheiro, que através da sua experiência e seriedade, sem esconder um sorriso, mesmo mais distante, inspirou e motivou o meu trabalho. Ao Dr. Simeão Moraes, que por diversas vezes esteve à disposição com ideias e sugestões. Sua paciência e seu humor sempre mantiveram um clima menos pesado no laboratório. À Dra. Gláucia Marconato, de quem guardo boas recordações e risadas, também foi quem me apresentou autores que tiveram grande influência na minha forma de enxergar este projeto. Ao Fabiano Albertoni, grande companheiro, que teve influência decisiva na organização do material para minhas coletas. À Ananda Martins, pela amizade calorosa e companheirismo em todos os momentos, em São Paulo e em Washington, DC. Ao Pedro Ivo, ex-mariposólogo, que esteve sempre aberto a conversas dos mais variados teores, por ter contribuído com o meu conhecimento do grupo. Ao Anderson Muñoz, pela companhia em festas e bebedeiras, e por me aguentar em momentos de desabafo. Ao Rafael Dell'Erba, por seu auxílio em campo. À Nalva, pela sua presença alegre e seu sorriso frequente, também pelas ótimas conversas. Por fim, ao técnico Renato, por seu auxílio no laboratório e em campo, e por diversas vezes ter se disposto às demandas deste projeto.

A todos os queridos colegas do Museu de Zoologia, que me emprestaram sua experiência e amizade, me ajudando a superar as etapas deste processo. Em especial, à Carol, ao Dr. Tiago, ao Lucas e à Dra. Rafaela, que me ajudaram durante as análises e a formar a minha base teórica. Também ao Juarez, pelas conversas e dicas sobre os métodos.

Aos meus amigos e companheiros de residência, que me aguentaram durante o meu último ano, Anna e Higor, por me permitirem uma convivência amistosa e tranquila na maior parte do tempo, imprescindível à realização deste trabalho.

À minha amada família, pelo apoio e suporte emocional necessários para a superação desta fase.

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste projeto e àqueles que, ao menos, participaram do processo duro de amadurecimento que gerou as ideias e as horas empenhadas nessa realização.

Índice

Lista de tabelas.....	i
Lista de figuras.....	ii
Introdução Geral	1
Objetivos gerais.....	5
Capítulo 1. Sistemática de Ambulycini (Lepidoptera, Sphingidae, Smerinthinae)	6
Resumo.....	6
1. Introdução.....	7
1.1. A Família Sphingidae Latreille, 1802.....	7
1.2. A tribo Ambulycini Butler, 1876.....	11
1.3. Estudos moleculares	14
1.4. Objetivos.....	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1. Coleta do material.....	16
2.2. Dados morfológicos.....	17
2.3. Dados moleculares.....	18
2.4. Análises filogenéticas	19
3. Resultados	22
3.1. Caracteres morfológicos	22
3.2. Dados moleculares.....	23
3.3. Análise filogenética de Ambulycini	24
4. Discussão.....	39
4.1. Contribuições morfológicas e moleculares na reconstrução filogenética de Ambulycini	39
4.2. Evidência total e a polifilia de <i>Adhemarius</i>	42
4.3. A monofilia de <i>Adhemarius eurysthenes</i>	43
4.4. Implicações biológicas e biogeográficas da hipótese adotada.....	44
5. Conclusão	47
Anexos.....	48
Lista de caracteres morfológicos	48
Capítulo 2. <i>Adhemarius eurysthenes</i> (Felder, [1874]) e a Mata Atlântica: uma perspectiva filogeográfica	118
Resumo.....	118
1. Introdução.....	118

1.1. Mata Atlântica	118
1.2. O papel dos genes	121
1.3. Objetivo	123
2. Material e métodos	123
2.1. Coleta do material.....	123
2.2. Dados moleculares.....	124
2.3. Análises filogeográficas	125
3. Resultados	126
3.1. Estruturação genética das populações de <i>Adhemarius eurysthenes</i>	131
3.2. Contribuições do DNA nuclear	131
4. Discussão.....	132
4.1. A importância da população do Espírito Santo	132
4.2. Populações de origem.....	134
4.3. <i>Adhemarius eurysthenes</i> : um indicador biológico para a conservação dos Ambulycini neotropicais?.....	135
5. Conclusão	136
Anexos.....	137
Capítulo 3. Descrição do ovo e primeiro ínstar de <i>Orecta lycidas</i> (Boisduval, [1875]) (Lepidoptera, Sphingidae).....	145
Resumo.....	145
1. Introdução.....	146
1.1. Objetivo	149
2. Material e Métodos.....	149
3. Resultados	150
3.1. Descrição do material	150
4. Discussão.....	158
5. Conclusão	162
Discussão Geral e Conclusões	163
Resumo	165
<i>Abstract</i>	167
Referências Bibliográficas	169
Material Suplementar.....	183

Lista de tabelas

Tabela 1.1. Localidades amostradas.	100
Tabela 1.2. Espécies neotropicais e o número de indivíduos de <i>Ambulycini</i> coletados em Estados brasileiros.....	100
Tabela 1.3. Inicializadores utilizados para a amplificação dos fragmentos propostos.	101
Tabela 1.4. Programas utilizados na amplificação dos marcadores moleculares. ...	101
Tabela 1.5. Códigos de acesso das sequências do GenBank analisadas no presente estudo.	102
Tabela 1.6. Número de identificação dos vouchers das análises.	103
Tabela 1.8. Genitálias estudadas.	108
Tabela 1.9. Plantas hospedeiras das larvas dos táxons analisados.	111
Tabela 1.10. Matriz de caracteres morfológicos.	113
Tabela 2.1. Quantidade de indivíduos de <i>Adhemarius eurysthenes</i> coletados por localidade amostrada.....	137
Tabela 2.2. Inicializadores utilizados para a amplificação dos fragmentos propostos	137
Tabela 2.3. Programas utilizados na amplificação dos marcadores moleculares. ...	138
Tabela 2.4. Distribuição dos haplótipos nas populações de <i>A. eurysthenes</i> estudadas.	138
Tabela 2.5. Sítios variáveis e mutações não-sinônimas de cada marcador.....	138
Tabela 2.6. Número de identificação dos vouchers de <i>Adhemarius eurysthenes</i> analisados.	139
Tabela 2.7. Abrangência de cada marcador nos 109 indivíduos de <i>Adhemarius eurysthenes</i> amostrados.	142

Lista de figuras

Figura 1.1. Diagrama mostrando a dicotomia entre gêneros Neotropicais e gêneros do Velho Mundo encontrada por Kawahara <i>et al.</i> (2009).	13
Figura 1.2. Topologia representando as relações filogenéticas entre os gêneros de Ambulycini, obtida com os dados morfológicos.	26
Figura 1.3. Árvore mais parcimoniosa 1 (A1).	30
Figura 1.4. Árvore mais parcimoniosa 2 (A2).	31
Figura 1.5. Árvore de Máxima Parcimônia com pesagem implícita (A3).	32
Figura 1.6. Árvore de Máxima Parcimônia com pesagem implícita (A3).	33
Figura 1.7. Árvore de Inferência Bayesiana para os conjuntos de dados morfológicos e moleculares combinados (evidência total – At).	35
Figura 1.8. Uma das sete árvores mais parcimoniosas da análise dos três marcadores moleculares combinados.	36
Figura 1.9. Árvore de consenso estrito das árvores mais parcimoniosas obtidas na análise dos três marcadores moleculares combinados.	37
Figura 1.10. Árvore de Máxima Verossimilhança dos três marcadores moleculares combinados com as sequências consenso para as espécies.	38
Figura 1.11. Árvore de Máxima Verossimilhança dos três marcadores moleculares combinados.	39
Figura 1.12. Hipótese filogenética de Ambulycini mostrando a evolução do hábito alimentar das larvas.	46
Figura 1.13. Probóscide.	48
Figura 1.14. Cabeça em vista frontal.	49
Figura 1.15. Palpo labial.	50
Figura 1.16. Cabeça em vista lateral.	52
Figura 1.17. Cabeça em vista frontal.	53
Figura 1.18. Escamas do rudimento do palpo maxilar.	54
Figura 1.19. Ápice da antena.	55
Figura 1.20. Tórax em vista dorsal.	56
Figura 1.21. Vista dorsal do tórax de duas espécies de <i>Adhemarius</i>	57
Figura 1.22. Ápice da tíbia anterior.	57
Figura 1.23. Espinhos da face anterior de pró-tíbia.	58
Figura 1.24. Esquema de um basitarso.	59
Figura 1.25. Ápice do fêmur.	60
Figura 1.26. Região distal dos tarsos das pernas posteriores.	61
Figura 1.27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do último tarsômero das pernas posteriores.	62
Figura 1.28. Esporões tibiais.	63
Figura 1.29. Esquema do abdômen de <i>A. eurysthenes</i>	64
Figura 1.30. Região entre o tórax e o abdômen em vista dorsal.	64
Figura 1.31. Extremidade posterior do abdômen de <i>P. goeldii</i> em vista ventral.	66
Figura 1.32. Porção distal do abdômen.	68

Figura 1.33. Órgão estridulatório.....	68
Figura 1.34. Esquema das escamas da cortina estridulatória.....	69
Figura 1.35. Esquema das asas de <i>Protambulyx strigilis</i>	70
Figura 1.36. Face dorsal da asa anterior de um Ambulycini genérico.....	71
Figura 1.37. Esquema da medição do alcance relativo entre as veias R4 e R5.	72
Figura 1.38. Asa anterior.	73
Figura 1.39. Ápice da asa anterior de <i>Protambulyx euryalus</i>	74
Figura 1.40. Asa anterior em vista ventral.....	79
Figura 1.41. Asa posterior em vista dorsal.	79
Figura 1.42. Asa posterior em vista ventral.	81
Figura 1.43. Genitália masculina em vista dorsal.	82
Figura 1.44. Genitália masculina. Face interna da valva.	83
Figura 1.45. Desenho esquemático do saco em vista ventral.	85
Figura 1.46. Genitália masculina. Gnato.	86
Figura 1.47. Desenho esquemático da juxta.	88
Figura 1.48. Genitália masculina. Edeago.	89
Figura 1.49. Genitália masculina. Vesica.	91
Figura 1.50. Genitália masculina. Edeago em vista lateral.....	92
Figura 1.51. Genitália feminina em vista ventral.....	93
Figura 1.52. Genitália feminina. Lamela pós-vaginal e apêndice do ântró.	95
Figura 1.53. Genitália feminina em vista ventral.....	96
Figura 1.54. Genitália feminina em vista lateral.....	97
Figura 1.55. Genitália feminina. Bolsa copulatória e signo.....	98
Figura 1.56. Alguns exemplares dos ademariformes.	99
 Figura 2.1. Mapa da distribuição dos haplótipos nas populações amostradas.....	128
Figura 2.2. Distâncias genéticas dentro das populações, calculadas com o modelo T92.	129
Figura 2.3. Distância genética média dentro das populações para cada um dos marcadores.	129
Figura 2.4. Árvore das sequências de COI dos indivíduos de <i>A. eurysthenes</i> coletados usando o método de Máxima Verossimilhança.	130
 Figura 3.1. Hábito da larva de primeiro ínstar de <i>Orecta lycidas</i>	154
Figura 3.2-6. Cápsula cefálica e aparelho bucal.	155
Figura 3.7. Segmentos torácicos e abdominais da larva de primeiro ínstar. Quetotaxia em vista lateral.	156
Figuras 3.8-11. Ovo.	157
Figuras 3.12-17. Larva.....	158
 Figura S1. Árvore de Inferência Bayesiana dos três marcadores moleculares combinados.	183
Figura S2. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene COI.	184

Figura S3. Árvore de COI obtida pelo método de Máxima Verossimilhança, sem as sequências do grupo externo.	185
Figura S4. Árvore de Máxima Verossimilhança de todas as sequências disponíveis para o gene CAD.	186
Figura S5. Árvore de <i>wingless</i> obtida pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo T92 e o parâmetro de sítios invariáveis.	187

Introdução Geral

Mariposas da família Sphingidae compreendem um dos grupos mais conspícuos e bem estudados da ordem Lepidoptera (Kawahara *et al.*, 2009; Kitching & Cadiou, 2000; Duarte *et al.*, 2012). Devido à sua importância ecológica como polinizadores e pragas, além do fato de adultos serem comumente coletados em armadilhas luminosas e de seu tamanho facilitar a identificação e a manipulação de amostras, elas são importantes modelos para estudos ecológicos e fisiológicos de apelos conservacionista e comercial (Cates, 1981; Dow *et al.*, 1984; Janzen, 1984; Barbosa *et al.*, 1990; Raguso *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 2003). Espécies de esfingídeos são os únicos lepidópteros capazes de manter um voo pairado e, com suas longas probóscides, polinizar flores com as corolas mais compridas conhecidas até o momento (Kitching, 2002; Regier *et al.*, 2008a; Kritsky, 2001; Rothschild & Jordan, 1903). As lagartas costumam ser grandes e de coloração vistosa; muitas, quando perturbadas, apresentam um comportamento que lhes dá a forma assemelhada de uma esfinge egípcia (Moré *et al.*, 2005). Como em boa parte das lagartas de Lepidoptera, estas são vorazes predadoras de vegetação, convertendo grande parte da biomassa ingerida em nutrientes para o solo na forma de fezes (Begon *et al.*, 2006).

Esfingídeos habitam todas as regiões do globo, exceto a Antártida e a Groenlândia (Moré *et al.*, 2005). Podem ser diurnos, crepusculares ou noturnos, porém as espécies diurnas da América do Sul são menos comuns que aquelas do Velho Mundo (Moré *et al.*, 2005). Na região neotropical, a maioria das espécies é atraída e coletada à noite, quando estão ativas geralmente se alimentando do néctar de flores esfingófilas (Kitching & Cadiou, 2000).

A família apresenta cerca de 210 gêneros e 1500 espécies (Nieukerken *et al.*, 2011), com aproximadamente um terço dos táxons registrados para a região neotropical (Heppner, 1991, 1998). Para o Brasil, são conhecidos 29 gêneros e 210 espécies (Duarte *et al.*, 2012). Alguns autores (e.g. Minet, 1994; Carcasson & Heppner, 1996; Lemaire & Minet, 1998; Kitching & Cadiou, 2000) classificam Sphingidae em três subfamílias: Macroglossinae, Sphinginae e Smerinthinae. Entretanto, dados moleculares de cinco genes nucleares contrariam a monofilia de Smerinthinae (Kawahara *et al.*, 2009) e apontam problemas nesta classificação. Segundo Kitching & Cadiou (2000), Smerinthinae está dividida em três tribos, das quais somente Ambulycini possui

representantes da fauna brasileira. Apesar de conflitarem com o agrupamento taxonômico proposto em Smerinthinae, os resultados de Kawahara *et al.* (2009) dão grande suporte à monofilia de Ambulycini.

A hipótese de Kawahara *et al.* (2009) também sugere a separação entre os gêneros neotropicais e os do Velho Mundo. Porém, os autores usaram apenas duas espécies de metade dos gêneros neotropicais em suas análises (*Adhemarius* Oiticica, 1939 e *Protambulyx* Rothschild & Jordan, 1903), o que limita consideravelmente a resolução do seu conjunto de dados. Assim, novos estudos que incluam os demais gêneros neotropicais de Ambulycini (*Orecta* Rothschild & Jordan, 1903 e *Trogolegnum* Rothschild & Jordan, 1903), e mais terminais de cada gênero, são necessários para o melhor embasamento das hipóteses sobre os relacionamentos entre os gêneros e seus padrões biogeográficos, além da própria monofilia da tribo.

Pouca informação sobre os esfingídeos de São Paulo encontra-se disponível na literatura. Duarte *et al.* (2008) publicaram a lista mais extensa de esfingídeos para uma localidade deste Estado (Estação Biológica de Boraceia, município de Salesópolis), fruto de coletas realizadas entre 1940 e 2004. Nesta lista, Smerinthinae foi a subfamília com menor número de táxons amostrados, correspondendo a 11% do material coletado (Duarte *et al.*, 2008). Ambulycini teve um total de sete espécies registradas, sendo duas de *Protambulyx* e cinco de *Adhemarius*. Entre as espécies mais frequentes da tribo, *A. eurysthenes* (Felder, [1874]) foi coletada ao longo de todos os meses do ano e *A. gannascus* (Stoll, 1790) só não foi coletada no mês de maio. Curiosamente, também em 2008, ano em que esta lista de esfingídeos foi publicada, dois alunos em expedição feita à mesma Estação, durante a disciplina optativa “Entomologia de Campo” (ministrada pelo Dr. Marcelo Duarte), coletaram um exemplar de *Orecta lycidas* (Boisduval, [1875]) que, até então, não tinha registro para a localidade no acervo de Lepidoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Apesar do surpreendente, e aparentemente novo, registro, exemplares desta espécie coletados entre 1940 e 2004 estavam depositados na coleção do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP) (Mielke & Haxaire, 2013) e no Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (M. Duarte, dados coligidos após a publicação da lista de 2008).

Orecta lycidas tem sido considerada uma espécie rara por conta das reduzidas séries de exemplares nas coleções entomológicas, mesmo para as localidades

extensivamente amostradas. Esta parece ser uma espécie com populações restritas e de tamanho reduzido (M. Duarte, dados não publicados provenientes de acervos nacionais e internacionais). No Brasil, têm-se poucos registros para as regiões sudeste e sul (MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS) do que se considera a subespécie *O. l. lycidas* (Rothschild & Jordan, 1903, Zikán, 1928). Fora de território nacional, os registros que vão da Bolívia ao Uruguai são geralmente relacionados a *O. lycidas eos* (Burmeister, 1878) (ver também Rothschild & Jordan, 1903; Kitching *et al.*, 2001; Mattoni & Penco, 2012). No Estado de São Paulo, cogitou-se a inclusão da espécie como quase ameaçada de extinção, conforme as categorias da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza, sigla em inglês). Entretanto, ela não consta na lista mais recente de espécies ameaçadas da fauna de São Paulo (DOE, Decreto nº 60.133, 07 de fevereiro de 2014). Pouco se sabe sobre o relacionamento de *O. lycidas* com os táxons geograficamente mais próximos.

Adhemarius eurysthenes (R. Felder, [1874]) é outra espécie neotropical de Ambulycini que ocorre na Mata Atlântica. Esta espécie está entre as mais abundantes nos levantamentos de Sphingidae em localidades de São Paulo realizados recentemente, podendo ser coletada em todos os meses do ano. A localidade-tipo de *A. eurysthenes* (*Ambulyx eurysthenes* Felder, [1874]), registrada por Felder, é Colômbia. *Ambulyx crethon* Boisduval, [1875], um de seus sinônimos juniores, foi descrita baseada em um único exemplar danificado macho, que foi provavelmente coletado no Peru ou na Bolívia (Boisduval, 1875). Já *Ambulyx schausi* Rothschild, 1894, descrita 20 anos depois e também sinônimo júnior de *A. eurysthenes*, tem Petrópolis, Rio de Janeiro, como localidade-tipo (Rothschild & Jordan, 1903). Os tipos de Felder e de Rothschild se encontram depositados no Museu de História Natural de Londres (NHM), na unidade de Tring, e, o de Boisduval, atualmente pertence ao Museu de História Natural de Carnegie, Pittsburgh (CMNH). Nenhum destes exemplares pode ser consultado pessoalmente durante o desenvolvimento deste trabalho, porém, no catálogo eletrônico do NHM, há apenas duas entradas para esta espécie, ambas coletadas em São Paulo, Brasil. Não havendo nenhum registro recente para a Colômbia e, tendo a localidade do holótipo de *A. crethon* sido corrigida para o Brasil (Kitching *et al.*, 2001), acredita-se que a distribuição atualmente conhecida para a espécie tenha o Paraguai como limite oeste. Do mesmo modo, alguns autores tratam com ceticismo o registro para a Colômbia (Oehlke, 2000), sendo mais provável que esta localidade

não se refira ao país, mas a outra região latino-americana mais ao sul, tal como o município homônimo de São Paulo (Brasil), posto não haver nenhum registro confirmado da espécie a noroeste do Paraguai.

Este trabalho está estruturado em três capítulos, sendo o primeiro sobre a filogenia de Ambulycini, o segundo sobre a filogeografia de *Adhemarius eurysthenes* em um contexto de Mata Atlântica e o terceiro contempla a descrição do ovo e do primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas*, com considerações sobre caracteres morfológicos de imaturos para o entendimento sistemático de Ambulycini.

Adhemarius eurysthenes e *Orecta lycidas* compartilham a mesma família de planta hospedeira larval e apresentam uma distribuição geográfica muito parecida. Além dessas semelhanças, características morfológicas evidenciam maior proximidade filogenética entre elas do que com outras espécies de Ambulycini. Este projeto foi pensado para ampliar o conhecimento sobre as relações filogenéticas entre e dentro destas espécies. Primeiramente, foi recuperada uma hipótese de parentesco para os táxons neotropicais com base em caracteres morfológicos e moleculares (Capítulo 1). Considerando-se que *O. lycidas* pode vir a ser confirmada como um táxon ameaçado de extinção devido ao tamanho aparentemente reduzido de suas populações, e considerando a abundância de *A. eurysthenes* em trabalhos de levantamento, foi realizado um estudo filogeográfico desta espécie, na expectativa de que a investigação genética das populações de *A. eurysthenes* possa contribuir para o entendimento dos padrões de organização da diversidade em *O. lycidas* (Capítulo 2). Através deste estudo, foi possível entender a relação entre esses organismos, com sabida capacidade de dispersão, e o ambiente compartilhado por ambas as espécies.

Alguns estudos têm demonstrado a importância das larvas de primeiro ínstar para a resolução de relacionamentos filogenéticos em níveis pouco inclusivos (Freitas & Brown, 2004; Duarte *et al.*, 2005). Ademais, a escassez de hipóteses de relacionamentos baseadas em caracteres morfológicos de Sphingidae em revistas de grande circulação e o fato das filogenias recentes com dados de imaturos demonstrarem: o pequeno conhecimento sobre a variação da quetotaxia dentro dos grupos e a possível influência das plantas hospedeiras sobre a distribuição das cerdas secundárias no ínstares mais avançados de algumas espécies (Kitching, 2002, 2003), evidenciam a importância de trabalhos descritivos sobre o primeiro ínstar. Da inexistência dessas informações para as lagartas de Ambulycini surge a necessidade de

publicações que levantem detalhes da morfologia de primeiro ínstar, do que trata o Capítulo 3 desta dissertação.

Objetivos gerais

- Testar a monofilia do grupo formado pelos Ambulycini neotropicais (Sphingidae, Smerinthinae) segundo Kawahara *et al.* (2009), com base em caracteres morfológicos e moleculares;
- Testar a monofilia dos gêneros neotropicais de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae), com base em caracteres morfológicos e moleculares;
- Elaborar uma hipótese para os relacionamentos filogenéticos entre os gêneros de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae);
- Testar a monofilia da linhagem composta pelas populações de *Adhemarius eurysthene*s;
- Analisar a estrutura e a variabilidade genética de populações de *Adhemarius eurysthene*s em território brasileiro e, de posse desses dados, subsidiar ideias que possam contribuir para a conservação de *Orecta lycidas* e espécies raras de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae), como a determinação de áreas com prioridade de preservação;
- Descrever o ovo e o primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas* para contribuir com o conhecimento de imaturos de Ambulycini e dar suporte a futuros trabalhos sistemáticos com a tribo.

Capítulo 1

Sistemática de Ambulycini (Lepidoptera, Sphingidae, Smerinthinae)

Resumo

As mariposas da família Sphingidae estão entre os Lepidoptera mais bem estudados e conhecidos do ponto de vista taxonômico. Muitas espécies chamam a atenção por seu porte e beleza, outras, porém, são conhecidas por devastar plantações e causar danos à economia. Ambulycini é uma pequena tribo com 86 espécies, tradicionalmente distribuídas em 10 gêneros, nunca antes estudada filogeneticamente com mais de cinco terminais. Dos seus representantes, quatro gêneros ocorrem na Região Neotropical e três deles têm registros de ocorrência na Mata Atlântica. Para se entender melhor os relacionamentos entre as espécies e os gêneros de Ambulycini, foram reunidos representantes de todos os gêneros e extraídas informações morfológicas e moleculares. Essas informações compuseram uma matriz de evidência total, que foi utilizada para a recuperação de uma hipótese filogenética robusta. Ambulycini forma um grupo monofilético fracamente sustentado pelos conjuntos de dados analisados. *Barbourion lemaii* é o grupo-irmão dos demais Ambulycini e o nó seguinte representa a divergência entre o gênero *Ambulyx* e o restante. Com exceção de *Adhemarius*, recuperado como grupo polifilético, todos os outros gêneros são monofiléticos. Os gêneros neotropicais compõem duas linhagens separadas, indicando que a diferenciação na América do Sul pode ter pelo menos duas origens independentes. *Adhemarius eurysthenes* foi a espécie mais bem amostrada para os marcadores moleculares, com informações de 10 populações ao longo de sua distribuição geográfica. Apesar de terem sido recuperados grupos de indivíduos com elevado bootstrap na população do Espírito Santo, valores de distância genética permitem a manutenção de todos os indivíduos sob a mesma designação taxonômica. A partir da hipótese de evidência total, escolhida como a que melhor explica a evolução de Ambulycini, foi verificada a utilização de planta hospedeira pelas larvas. Diferenças nessa característica da biologia das espécies é consistente com a separação de duas linhagens entre os Ambulycini neotropicais.

1. Introdução

1.1. A Família Sphingidae Latreille, 1802

Lepidoptera, grupo que reúne borboletas e mariposas, é uma das cinco ordens megadiversas de insetos (juntamente com Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Hemiptera, ver Rafael *et al.*, 2012), com uma estimativa de mais de 500 mil espécies em todo o mundo (Gaston, 1991). Filogeneticamente, esta Ordem está relacionada nas propostas mais recentes, tanto as baseadas em dados morfológicos quanto em dados moleculares, como grupo-irmão da Ordem Trichoptera, insetos principalmente conhecidos por suas larvas predadoras, dulcícolas, geralmente de ambiente lótico, que constroem elaborados estojos de proteção a partir de substratos variados (Kristensen, 1981; Grimaldi & Engel, 2005; Trautwein *et al.*, 2012; Paprocki, 2012). Juntas, essas duas ordens formam o clado fortemente corroborado e conhecido como Amphiesmenoptera, grupo-irmão de Antliophora (Mecoptera, Siphonaptera e Diptera) em algumas das principais hipóteses filogenéticas de Holometabola (Kristensen, 1981; Kristensen, 1998; Trautwein *et al.*, 2012).

Acredita-se que no início do período Jurássico, insetos provavelmente parecidos com alguns microlepidópteros recentes se diversificaram dando origem às linhagens viventes de Lepidoptera (Kristensen & Skalski, 1998), embora trabalhos modernos, usando conjuntos de dados moleculares e métodos específicos de análise (“*Bayesian relaxed clock*”), apontem para uma origem mais precoce (Wahlberg *et al.*, 2013). Análises cladísticas indicam que a separação entre a Subordem Zeugloptera e os demais lepidópteros pode ter sido a dicotomia mais antiga do clado Lepidoptera (Kristensen *et al.*, 2007). A fusão das gálea da maxila, formando uma probóscide funcional, caracteriza a próxima grande divisão, que dá origem aos Glossata. Dentro deste grupo, surgem os Heteroneura, caracterizados pela redução do número de veias da asa posterior. A linhagem de Heteroneura com maior número de espécies conhecidas e maior distribuição geográfica, denominada Ditrysia, é caracterizada pela comunicação interna entre o ducto copulatório e o oviduto na genitália das fêmeas. Obtectomera, uma das dez linhagens de Ditrysia, reúne o grupo Macrolepidoptera e mais seis superfamílias piralóides pela falta de mobilidade dos segmentos A1-A4 e a ausência das fileiras dorsais de espinhos nas pupas. Verifica-se, neste táxon, a principal radiação conhecida da história da Ordem Lepidoptera, a qual originou o grupo Macrolepidoptera, que inclui a maior parte das mariposas e todas as borboletas

descritas e é reunido pelo compartilhamento da perda da veia CuP das asas posteriores e pela organização dos ganchos dos larvópodes em mesossérie (Duarte *et al.*, 2012). Macrolepidoptera compreende onze superfamílias pelas classificações atuais e é ainda frequentemente tratado como um clado, apesar de testes estatísticos (e.g. Shimodaira, 2002) comparando as filogenias conhecidas e inferências de dados paleontológicos sugerirem que ele possa não ser um grupo monofilético, graças ao posicionamento incerto da superfamília Pyraloidea em relação ao grupo formado por seus demais representantes (Kristensen & Skalski, 1998; Goldsmith & Marec, 2010). Mais recentemente, valendo-se das técnicas de sequenciamento de nova-geração, Kawahara & Breinholt (2014) elaboraram a primeira hipótese filogenética baseada em transcriptomas objetivando elucidar os relacionamentos entre borboletas e mariposas dentro de Obtectomera. Nesta hipótese, Papilionoidea, Hesperioidea e Hedyloidea formam, com grande suporte, o grupo-irmão de todos os demais Obtectomera (Duarte *et al.*, 2012).

Minet (1994) publicou a hipótese filogenética para Bombycoidea, uma das superfamílias de Macrolepidoptera, mais amplamente aceita até as primeiras propostas utilizando dados moleculares (Regier *et al.*, 2008a). Baseado apenas em dados morfológicos, Minet agrupou, sob a definição de complexo borbóricoide, as superfamílias Mimallonoidea, Lasiocampoidea e Bombycoidea pela presença de cerdas secundárias nas pernas anais das larvas, imago sem ocelos funcionais, mesepímero e mero com uma longa linha de junção. Nesta hipótese, a monofilia de Bombycoidea é mais bem suportada que a das demais superfamílias, e também que a monofilia do complexo borbóricoide, suportada principalmente por reduções e homoplasias (Minet, 1994). Possíveis sinapomorfias desta superfamília são: coxas protorácicas do último ínstar fundidas anteriormente; cerda D1 do segmento abdominal A8 nas larvas partindo de um escole médio-dorsal; venação de Rs1+Rs2 muito próximas ou fundidas ao ramo Rs3+Rs4; músculos flexores das valvas originando-se no tegume e não no vínculo (Minet, 1994). Das nove famílias de Bombycoidea, as duas maiores, em termos de número de espécies (Saturniidae e Sphingidae, com cerca de 1300 e 1200 espécies, respectivamente), são também as únicas famílias cosmopolitas (Regier *et al.*, 2008a).

Em Bombycoidea, Sphingidae aparece como grupo-irmão do clado que reúne Brahmaeidae e Lemoniidae (*sensu* Minet, 1994), com as quais supostamente compartilha as apomorfias: metanoto da pupa conspicuamente esculturado, palpos

maxilares com no máximo dois artículos no adulto, braço posterior do mesepímero distintamente encurtado com uma área fracamente esclerotizada perto da região terminal da linha de junção mero-epímero, veia Sc+R da asa posterior se aproximando da seção pós-discal da veia Rs. A monofilia de Sphingidae é bem suportada por nove sinapomorfias morfológicas listadas por Minet (1994): listras oblíquas laterais sobre os segmentos A1-A8 nas larvas; partes expostas das asas posteriores nunca alcançando o segmento A4 nas pupas; braço ventral do esclerito cervical terminando abruptamente em uma barra fina no adulto; extremidades dorsais da fenda pré-escutal do mesonoto muito próximas ou distintamente unidas nos adultos; maior parte ou todo o processo ventral da tégula não esclerotizado; surgimento da veia M2 um pouco mais próximo de M3 do que de M1 nas asas anteriores; margem da asa posterior projetado ou angulado no ápice da veia 1A+2A; braços secundários da metafurca distalmente providos de lobo fortemente esclerotizado reforçando a membrana intersegmental torácico-abdominal próximo do esternito de A2; cavidade do ‘aro tergal’ caudalmente ampla (Minet, 1994: 85). Porém, a monofilia de cada umas das três subfamílias previstas para Sphingidae foi considerada menos convincente do que o estabelecido para a família (Minet, 1994).

Baseados em marcadores moleculares, trabalhos recentes sobre a filogenia do complexo bomicóide e de grupos internos a ele têm levantado novas hipóteses sobre os relacionamentos entre as superfamílias e dentro de Bombycoidea (Regier *et al.*, 2001, 2008a, 2008b, Zwick, 2008; Zwick *et al.*, 2011, Kawahara *et al.*, 2009). Regier *et al.* (2008a), analisando cinco genes nucleares codificadores de proteínas corroboraram a monofilia do complexo bomicóide proposto por Minet (1994). Eles conclusivamente realocaram Anthelidae, que na hipótese de Minet (1994) estava dentro de Lasiocampoidea, para Bombycoidea e trataram o grupo como Bombycoidea *sensu stricto*. Outra grande mudança foi a separação de (Sphingidae, (Brahmaeidae, Lemoniidae)), que na nova topologia gerou agrupamentos distintos: ((Brahmaeidae, Lemoniidae), Eupterotidae, Apatelodinae) de um lado e (Sphingidae, Saturniidae, Bombycinae, (demais Bombycoidea *sensu stricto*)) do outro. Vale notar que Apatelodinae e Bombycinae são duas subfamílias de Bombycidae *sensu* Minet, o que demonstra sua polifilia na topologia baseada em dados moleculares. Zwick (2008), trabalhando principalmente com Anthelidae, fez uma grande amostragem dentro do complexo bomicóide e corroborou a posição dessa família dentro de Bombycoidea *sensu stricto*. Em uma de suas topologias, Sphingidae aparece como grupo-irmão de

Bombycidae *sensu stricto* pela análise de Máxima Verossimilhança, porém, esta configuração não apresenta suporte (bootstrap <50%). Zwick *et al.* (2011) analisaram 11,7 kbp de 20 genes nucleares até então não utilizados na literatura para a resolução filogenética de Bombycoidea, expandindo o conjunto de dados do trabalho de Regier *et al.* (2008a). Foram utilizados 50 táxons de bombicóides e lasiocampóides. Assim, obtiveram resultados robustos para os nós mais inclusivos, o que ainda não se havia conseguido, e, dessa forma, apresentaram diversas modificações taxonômicas, dentre as quais, destacam-se: a definição da família Bombycidae, que passa oficialmente a ser representada apenas pela sua subfamília nominal, Bombycinae, e pela tribo Epiini, que é elevada à subfamília. No grupo referido pelos autores como ‘SBS’ (Sphingidae, Bombycidae e Saturniidae), o clado Saturniidae+Bombycidae *sensu stricto* apresentou um suporte modesto (i.e. bootstrap igual a 70%) em apenas uma das seis análises realizadas. Por fim, com seu enorme conjunto de dados, mas com apenas poucos representantes para cada família, Kawahara & Breinholt (2014) obtiveram o robusto resultado (valores de bootstrap iguais a 68/96/99) que define ‘SBS’ como: (Bombycidae, (Saturniidae, Sphingidae)). Entretanto, para a resolução encontrada com o clado Saturniidae+Sphingidae, há a ressalva de que foi incluído apenas o gênero *Bombyx* Linnaeus, 1758 como representante de Bombycidae.

Os dados morfológicos foram historicamente pouco explorados para a construção de hipóteses de parentesco dentro da família Sphingidae. Rothschild & Jordan (1903) apresentaram um estudo morfológico comparativo e propuseram algumas ideias de relacionamento, porém suas análises não tiveram uma padronização metodológica. Ainda antes do trabalho apresentados por Minet (1994), Nakamura (1976, *apud* Kawahara *et al.*, 2009) trouxe a maior contribuição sistemática para o grupo, propondo relacionamentos entre os gêneros de esfingídeos japoneses baseados em caracteres de larva e pupa, sem uma análise explicitamente cladística. Regier *et al.* (2001) publicaram a primeira filogenia molecular de Sphingidae. Usando a sequência de apenas dois genes (EF- α e DDC) e com uma baixa representatividade de táxons (18 gêneros sendo 14 de Sphingidae, dois de Brahmaeidae e dois de Saturniidae), seus resultados são consideravelmente distintos das propostas atuais. A subfamília Smerinthinae, por exemplo, foi considerada monofilética, embora tenham sido analisados apenas dois representantes. Apesar disso, a geração das primeiras evidências moleculares para a monofilia da família foi sua principal contribuição. Alguns anos

mais tarde, Kawahara *et al.* (2009) confirmaram a parafilia de Smerinthinae através de seu conjunto de dados. Entretanto, por não usar representantes de fora da família, não foi testado o relacionamento de Sphingidae com outras famílias de Bombycoidea nem sua reconhecida e fortemente suportada monofilia (Minet, 1994; Lemaire & Minet, 1998; Regier *et al.*, 2001).

Das três subfamílias da classificação encontrada em Kitching & Cadiou (2000) apenas Macroglossinae tem uma autapomorfia morfológica extensivamente testada: primeiro artigo dos palpos labiais com uma mancha de sensilas na superfície interna. Rothschild & Jordan (1903) classificaram Sphingidae em ‘Semanophorae’ e ‘Asemanophorae’ pela presença e ausência dessa característica, respectivamente, e esta foi uma das apomorfias usadas por Hodges (1971) para justificar a divisão de Sphingidae em duas subfamílias (Sphinginae e Macroglossinae). Entretanto, como destacou Minet (1994), a ausência dessa modificação é plesiomórfica. Apesar de não ter sido testada na construção de um cladograma, uma única sinapomorfia morfológica foi proposta por Minet (1994) para definir a subfamília Smerinthinae: cápsula cefálica do segundo ínstar larval projetada apicalmente, assumindo formato cônico (Minet 1994: 85).

1.2. A tribo Ambulycini Butler, 1876

“Ambulicinae” foi o táxon criado por Butler (1876) e, com o mesmo status, é tratado na monumental revisão de Rothschild & Jordan (1903) para agrupar os Ambulycini e parte dos Smerinthinae e Sphingulinae da classificação de Kitching & Cadiou (2000). Para esses autores, não havia um único caráter que os separassem de “Acherontiinae”, apesar da ausência de uma crista mediotarsal, que supostamente separava “Ambulicinae” de “Sphingicae” (tribo de “Acherontiinae” pela nomenclatura da época) (Rothschild & Jordan, 1903). Larvas com cabeça triangular é quase uma característica exclusiva de “Ambulicinae” e todas elas possuem a superfície do corpo granulosa ou espinhosa (Rothschild & Jordan, 1903). Argumentando com o que foi observado para os grupos mais próximos (e.g. “Acherontiinae”), Rothschild & Jordan (1903) postularam *Protambulyx* Rothschild & Jordan, 1903 e seus aliados como as linhagens da base da filogenia de “Ambulicinae”, posto que as principais derivações observadas baseiam-se em reduções e perdas de estruturas, como se observa em *Cypa* Walker, 1865. Mesmo sem o aparato metodológico da Sistemática Filogenética (Hennig, 1966), Rothschild & Jordan (1903) elaboraram uma organizada hipótese de

parentesco e traçaram o plano básico ('forma ancestral') dos "Ambulicinae" por um conjunto de características morfológicas, entre as quais: probóscide alcançando o final do abdômen; palpos labiais proeminentes; fronte com crista transversal de escamas, desprovida de crista mediana; ausência de "cílios"; artículo terminal das antenas longo, com longas escamas; frênuo e retináculo presentes; dois pares desiguais de esporões na tíbia posterior; pulvilo ("paronychium") com dois pares de lobos; arólio ("pulvilo") presente; escamas de fricção sobre as valvas e no oitavo tergito; cabeça triangular na 'larva adulta'.

Janse (1932), seguido mais tarde por Carcasson (1968), foi quem primeiro alterou a classificação de Rothschild & Jordan (1903), elevando as divisões Asemanophorae e Semanophorae à subfamília e mantendo as subfamílias como tribos. Hodges (1971) tratou Ambulycini como Smerinthini, pelo princípio da prioridade. Nakamura (1976, 1977, 1978, *apud* Kitching & Cadiou, 2000) realocou um subgrupo de Smerinthini, que chamou de Ambulycina, para Sphingini, o qual foi remanejado novamente por Derzhavets (1984) como subtribo para Smerinthini. Finalmente, Minet (1994) elevou Smerinthini à subfamília e essa classificação é a mesma utilizada por Kitching & Cadiou (2000) para a tribo Ambulycini. Estudos recentes têm apontado para a parafilia da subfamília Smerinthinae (Kawahara *et al.*, 2009), indicando a necessidade de revisões taxonômicas sobre o grupo. Hipotetizada como a subfamília mais semelhante ao plano basal de Sphingidae (Kitching & Cadiou, 2000), Smerinthinae agrupa os representantes da tribo Smerinthini também por não possuírem probóscide desenvolvida, condição postulada como ancestral para a família (Kawahara, 2007), apesar de Kitching & Cadiou (2000) não terem dúvidas quanto a sua parafilia. Já em Ambulycini, todos os seus representantes possuem essa estrutura desenvolvida, apesar de haver uma pequena redução em dois gêneros Neotropicais: *Trogolegnum* e *Orecta* (Rothschild & Jordan, 1903).

De acordo com Kitching & Cadiou (2000), Ambulycini é composta por dez gêneros: *Adhemarius* Oiticica Filho, 1939, *Akbesia* Rothschild & Jordan, 1903, *Ambulyx* Westwood, 1847, *Amphypterus* Hübner, [1819], *Barbourion* Clark, 1934, *Batocnema* Rothschild & Jordan, 1903, *Compsulyx* Holloway, 1979, *Orecta* Rothschild & Jordan, 1903, *Protambulyx* Rothschild & Jordan, 1903 e *Trogolegnum* Rothschild & Jordan, 1903. Se somados apenas os dois maiores (*Adhemarius* e *Ambulyx*) são mais de 75% das espécies atualmente reconhecidas para a tribo (Kitching & Cadiou, 2000).

Quatro são os gêneros que ocorrem na região Neotropical: *Adhemarius*, *Orecta*, *Protambulyx* e *Trogolegnum*. *Batocnema* é endêmico do sul do continente africano e de Madagascar, e é o único Ambulycini da região Afrotropical (Matyot, 2005). *Compsulyx*, gênero monotípico, possui o único representante da região Australiana, que pode ser encontrado em Nova Caledônia (dados não publicados de etiquetas e do sítio <http://sphingidae.myspecies.info/>). Todos os demais gêneros estão distribuídos pelas regiões Paleártica e Oriental (Rothschild & Jordan, 1903; Bell & Scott, 1937; Kitching & Cadiou, 2000). Seu tamanho corporal varia de indivíduos de pequeno porte, como *Akbesia davidi*, com envergadura alar podendo medir menos de 50 mm, a indivíduos de grande porte, como as espécies do gênero *Ampllypterus* e *Ambulyx pryeri* com envergadura alar em torno de 140 mm (medidas obtidas de espécimes do acervo do MZUSP).

Kitching & Cadiou (2000) informalmente apresentam uma hipótese filogenética baseada em dados morfológicos. Por não representarem sua proposta em um diagrama formal e de fácil visualização, como um cladograma, existe a dúvida de qual a real topologia da hipótese. Diferentemente do que é apresentado para as demais tribos de Smerinthinae, Ambulycini forma um grupo monofilético. Aparentemente, *Ambulyx* é considerado o táxon mais ‘basal’, conforme terminologia utilizada pelos autores, seguido por *Barbourion* e *Ampllypterus*, não obstante estes três táxons igualmente formem uma tricotomia pelo sistema de representação adotado. Os demais gêneros formam ainda outro grupo monofilético, no qual *Compsulyx* é considerado o táxon mais ‘basal’. Já Kawahara *et al.* (2009), valendo-se do seu expressivo conjunto de dados moleculares, porém com baixa representatividade taxonômica, apontam a clara dicotomia entre ((*Adhemarius*, *Protambulyx*), (*Ambulyx*, *Ampllypterus*)) e apresenta uma hipótese de ancestralidade comum entre os gêneros neotropicais.

Figura 1.1. Diagrama mostrando a dicotomia entre gêneros Neotropicais e gêneros do Velho Mundo encontrada por Kawahara *et al.* (2009), com os valores de bootstrap obtidos.

Apesar de extensivamente coletados pela indiscutível beleza do padrão de coloração e pelo porte avantajado da maior parte das espécies, verifica-se uma lacuna

no conhecimento taxonômico da tribo resultante da carência de estudos em Sistemática. A maior parte das análises que utilizaram explicitamente o método filogenético restringiram-se a tribos e gêneros pouco relacionados à Ambulycini (Kawahara *et al.*, 2009), como Acherontiini (Kitching, 2002, 2003).

1.3. Estudos moleculares

Filogenias baseadas em genes podem apresentar problemas intrínsecos deste conjunto de dados. A resolução filogenética em níveis taxonômicos mais inclusivos necessita de variações confiáveis na composição de bases nitrogenadas dos genes investigados (Regier *et al.*, 2008a). Variações dessa natureza podem ser basicamente de quatro tipos, sendo dois deles mais comuns: variações sinônimas e variações não-sinônimas. As variações sinônimas são aquelas que não produzem mudança de aminoácidos, em caso de genes codificadores de proteínas. Isso se deve ao fato de as trincas de nucleotídeos (códon) relacionadas com a codificação dos aminoácidos permitirem diferentes combinações que resultam na escolha da mesma molécula. Dessa forma, substituições sinônimas são, na maioria dos casos, silenciosas, isto é, não causam alterações nas proteínas (ver Zhou *et al.*, 2012 e Carlini *et al.*, 2003, para mutações não-silenciosas). Nestes casos, são mutações neutras e, assim, fixadas com maior facilidade. Essas variações são muito abundantes e sua problemática na resolução de nós mais inclusivos está relacionada à alta frequência de substituições múltiplas e sobrepostas e de heterogeneidade na composição de bases dentro dos táxons (Regier *et al.*, 2008a; Campbell *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 1997), situações ainda mais comuns nas sequências de evolução rápida, como as do DNA mitocondrial. Variações não-sinônimas, por sua vez, são menos frequentes e podem ser mais confiáveis na resolução de relações mais profundas. Entretanto, por sua baixa frequência, é necessária uma grande amostragem genética para se obter resultados robustos (Regier *et al.*, 2008a). Isto é particularmente importante em situações de entrenós curtos, de rápida cladogênese (Kristensen & Skalski, 1998). Assim, a combinação de dados moleculares com diferentes taxas de evolução podem, virtualmente, traçar toda a história evolutiva de um organismo, em seus diferentes níveis taxonômicos. No entanto, em casos de limitada amostragem de genes, a inclusão de dados morfológicos com acentuado sinal filogenético, além de auxiliar na interpretação dos resultados, compensa a escassez de informação e pode corrigir incongruências entre genes.

A região anterior do gene codificador da subunidade I da enzima Citocromo c Oxidase (COI) foi proposta por Hebert *et al.* (2003a, b) como um código de barras para a identificação de espécies animais e tem sido bastante utilizada para estudos de filogenia e filogeografia em Lepidoptera (Silva-Brandão *et al.*, 2009). Utilizando marcadores de outras partes do genoma, como do DNA nuclear, pode-se aumentar o suporte das hipóteses filogenéticas.

Ambulycini não apresenta, até o momento, nenhuma hipótese filogenética formal, com o emprego de uma metodologia de otimização, que envolva mais de cinco táxons da tribo. Apesar da tribo ser considerada monofilética nas últimas abordagens filogenéticas para a família Sphingidae (Kawahara *et al.*, 2009), inexistem trabalhos que tenham incluído terminais de todos os seus gêneros, o que enfraquece sua atual organização taxonômica. Tendo em vista a importância da resolução filogenética para o entendimento de processos evolutivos mais específicos e também a lacuna gerada pela carência de estudos sistemáticos mais abrangentes, foi elaborada uma hipótese filogenética consistente para o grupo. Além disso, acredita-se que para maximizar a utilidade e o valor da enorme quantidade de dados moleculares existente para sistemas modelos encontrados em Bombycoidea (vide seção 1.1), são necessários estudos filogenéticos dos vários níveis taxonômicos (Goldsmith & Marec, 2010).

Considerando que *O. lycidas* possa ser confirmada como um táxon ameaçado de extinção pelos impactos antrópicos em suas populações de tamanho reduzido, torna-se fundamental compreender o relacionamento filogenético dessa espécie com os demais táxons neotropicais de Ambulycini, primeiramente para permitir a escolha de modelos apropriados para se inferir as formas de interação desta espécie com o meio onde ela vive. Nesse sentido, hipóteses filogenéticas com base na análise de caracteres morfológicos destas espécies, bem como de outros representantes da tribo, são imprescindíveis. Além dos dados morfológicos, dados moleculares disponíveis no banco de dados internacional (Genbank) e obtidos de amostras coletadas em ambiente natural podem contribuir para uma maior robustez das hipóteses filogenéticas.

1.4. Objetivos

- Testar a monofilia do grupo formado pelos Ambulycini neotropicais (Sphingidae, Smerinthinae) segundo Kawahara *et al.* (2009), com base em caracteres morfológicos e moleculares;

- Testar a monofilia dos gêneros neotropicais de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae), com base em caracteres morfológicos e moleculares;
- Elaborar uma hipótese para os relacionamentos filogenéticos entre os gêneros de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae);
- Testar a monofilia da linhagem composta pelas populações de *Adhemarius eurysthenes*.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta do material

Parte do material estudado no presente trabalho é proveniente das expedições realizadas pela equipe do Laboratório de Lepidoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), em localidades da região sudeste do Brasil (ver Tabela 1.1 para as localidades amostradas). Material de localidades da América Central e de outros países da América do Sul, bem como espécies de outros continentes foram obtidos por meio de colaborações com especialistas trabalhando nessas áreas.

Além do material depositado no Museu de Zoologia da USP, as seguintes coleções foram consultadas, pessoalmente ou com a ajuda de terceiros (ver agradecimentos), para estudo do maior número possível de exemplares da tribo Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae).

BMNH	British Museum of Natural History, Londres, Inglaterra (Dr. Ian Kitching).
DZUP	Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil (Drs. Olaf H. H. Mielke e Mirna M. Casagrande).
MNHN	Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris, França (Dr. Joël Minet)
MNRJ	Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Dr. Miguel A. Monné Barrios).
USNM	Department of Entomology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, Estados Unidos (Dr. John Brown).
ZSM	Zoologische Staatssammlung München, Munique, Alemanha (Dr. Axel Hausmann).

Foi realizada ainda uma visita técnica de aproximadamente um mês ao National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, EUA, com financiamento obtido através de edital junto à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, para o estudo do acervo. O material obtido como empréstimo está representado na Tabela 1.7. Com esta visita, foram incluídas duas espécies no grupo externo: *Parum colligata* (Walker, 1856) e *Daphnusa ailanti* (Boisduval, [1875]) pela proximidade filogenética com a tribo (ambas espécies pertencentes à tribo Smerinthini e cujos gêneros foram analisados por Kawahara *et al.*, 2009) e semelhança em relação à morfologia externa e padrão de coloração.

2.2. Dados morfológicos

Foram levantados caracteres da morfologia externa e das genitálias para estudo das relações filogenéticas dentro da tribo Ambulycini. Foi realizada, quando possível, a dissecação de pelo menos um exemplar de cada sexo, incluindo as espécies do grupo externo. As genitálias foram dissecadas seguindo-se o protocolo-padrão de fervura em solução de hidróxido de potássio a 10% (Ehrlich & Ehrlich, 1961), para o amolecimento dos tecidos e clarificação do exoesqueleto. Caracteres da estrutura externa da cabeça, tórax, pernas, abdômen e aqueles relacionados ao padrão de coloração das asas foram estudados diretamente sob um estereomicroscópio. Asas foram diafanizadas através de uma rápida passagem por etanol 96 °GL, seguido por secagem e imersão em solução contendo hipoclorito de sódio (água sanitária comercial), para descoloração das escamas e o estudo comparativo entre a disposição das veias nas asas anteriores e posteriores. Quatro indivíduos de quatro espécies diferentes (*A. gannascus* (Stoll, [1790]), *A. daphne* (Boisduval, [1875]), *P. strigilis* (Linnaeus, 1771), *P. eurycles* (Herrich-Schäffer, [1855])) foram completamente dissecados na busca por caracteres encobertos pelas escamas (para os autores de todas as espécies estudadas ver Tabela 1.7). A terminologia adotada para nomear as estruturas do corpo seguiu os trabalhos de Rothschild & Jordan (1903), Eaton (1988), Kitching (2002, 2003), para as estruturas de genitália masculina e feminina, os trabalhos de Sibatani *et al.* (1954) e Klots (1970) e, para os elementos de coloração das asas, Nijhout (1991).

Pesquisas bibliográficas para o levantamento de trabalhos de filogenia baseada em caracteres morfológicos foram realizadas, buscando-se caracteres informativos testados em outras hipóteses filogenéticas e com o intuito de aumentar o conjunto de

dados para a construção da matriz (Rothschild & Jordan, 1903; Kitching, 2002, 2003). Alguns caracteres de estruturas danificadas, ou de exemplares faltantes, foram consultados em fotos disponíveis em Kitching (2015).

2.3. Dados moleculares

Para as análises filogenéticas dos gêneros de Ambulycini foram estudados três genes ou fragmentos de genes, sendo dois pertencentes ao DNA nuclear (a região terminal da carbamoil-fosfato sintase – CAD, ca. de 850 pb – e *wingless*, ca. de 400 pb) e um do DNA mitocondrial (extremidade 5' da subunidade I da enzima Citocromo c Oxidase – COI, ca. de 658 pb). O DNA genômico total foi extraído das pernas meso- e/ou metatorácicas de indivíduos coletados dos gêneros *Adhemarius*, *Protambulyx* e *Orecta* (ver Tabelas 1.2 e 1.6), seguindo-se o protocolo do Kit DNeasy Blood and Tissue da Qiagen (QIAGEN Redwood City, CA, EUA). Para tanto, esses apêndices foram destacados dos exemplares durante a coleta e acondicionados em frascos contendo álcool etílico absoluto 99,8% P.A Impex, sendo posteriormente armazenados em freezer a - 20 °C. Após a extração do DNA genômico, foram amplificados a extremidade 5' do gene COI e fragmentos dos genes nucleares CAD e *wingless* (ver Tabela 1.4 com os oligonucleotídeos inicializadores utilizados). Sequências dos três marcadores para as espécies que não puderam ser coletadas foram obtidas do banco de dados *on-line* (Benson *et al.*, 2011) quando disponíveis. A Tabela 1.5 contém a relação destas sequências com seus respectivos códigos de acesso.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com o volume total de 22 µl de solução contendo 1,5 µl de DNA molde, 14,3 µl de H₂O milli-Q, 2,5 µl de 10X buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1% Triton X-100, pH 8.3), 0,5 µl de dNTPs a 10 mM, 1 µl de cada inicializador a 10 mM, 2 µl de MgCl₂ a 25 mM, 0,2 µl de GoTaq® Taq DNA-polimerase (Promega Corporation, EUA). Os programas utilizados na amplificação foram padronizados tendo como base os protocolos descritos em Silva-Brandão *et al.* (2005) para o gene COI e Wahlberg & Wheat (2008) para os fragmentos de CAD e *wingless* (ver Tabela 1.4.).

Os produtos das reações de amplificação foram purificados através do protocolo ExoSAP-IT (GE Healthcare, Bucks, UK), e sequenciados seguindo-se o protocolo do kit Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems Inc., USA) em um Sequenciador Automático 3500XL DNA ABI PRISM (Applied Biosystems Inc., EUA), utilizando-se os inicializadores senso e/ou anti-senso usados na amplificação. A

maioria das amostras foram sequenciadas utilizando apenas a cadeia senso. Entretanto, pela dificuldade de se obter as sequências do fragmento do gene CAD, bem como sequências de algumas das amostras para os outros marcadores, em alguns casos foram sequenciadas as cadeias senso e a anti-senso. A qualidade das sequências foi avaliada com o programa Finch-TV 1.4.0 (Geospiza Inc., EUA) e as sequências foram alinhadas a olho com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Foi utilizada a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) através do sítio do Genbank para realizar os primeiros alinhamentos das sequências obtidas.

2.4. Análises filogenéticas

Foram escolhidos para formação do grupo interno o maior número possível de representantes da tribo Ambulycini. Os dez gêneros arrolados pela classificação de Kitching & Cadiou (2000) foram amostrados. *Adhemarius* possui dezessete espécies (Oehlke, 2000), nove das quais foram analisadas. O gênero pode ser separado em pelo menos cinco morfotipos razoavelmente distintos (Figura 1.56), que serão tratados aqui como: *tigrina* (Figura 1.56F), *sexoculata* (Figura 1.56E), *ypsilon* (Figura 1.56D), *gannascus* (Figura 1.56C) e *dariensis* (Figura 1.56A). Destes, apenas o morfotipo *ypsilon* não foi incluído na análise morfológica. *Ambulyx* é o maior gênero da tribo e possui 49 espécies (Kitching & Cadiou, 2000). Por ser um gênero que ocorre somente na Ásia e na Oceania, e ter poucas espécies representadas na maioria das coleções visitadas e contatadas, apenas as cinco espécies mais acessíveis foram estudadas. Foram utilizadas também todas as oito espécies de *Protambulyx*, duas espécies de *Orecta*, as duas espécies de *Batocnema*, uma das duas espécies de *Amplypterus* e os quatro gêneros monotípicos: *Akbesia*, *Barbourion*, *Compsulyx* e *Trogolegnum*.

Para a formação do grupo externo foram escolhidas três espécies da tribo Smerinthini: *Cypa decolor* (Walker, 1856), *Daphnusa aйлanti* e *Parum colligata*. Esta composição está de acordo com o método proposto por Nixon & Carpenter (1993) para a seleção do grupo externo. *Cypa decolor* foi escolhida por ser grupo-irmão de todos os Ambulycini na filogenia obtida por Kawahara *et al.* (2009). As outras duas espécies foram escolhidas por apresentarem semelhanças na morfologia externa que poderiam se confirmar como sinapomorfias inclusivas após as análises. Os terminais que compuseram o estudo filogenético estão indicados na Tabela 1.7.

Todos os caracteres morfológicos usados na filogenia foram obtidos das formas adultas. Salvo se disposto em contrário, os caracteres e seus estados representam variações encontradas em machos e fêmeas. Os caracteres foram estruturados seguindo-se o modelo lógico apresentado por Sereno (2007), respeitando os critérios de interdependência e de condições mutuamente exclusivas de seus estados. Foram utilizados preferencialmente caracteres contingentes, por favorecerem a formação de grupos mais inclusivos, embora o uso de caracteres multiestados tenha sido inevitável para a incorporação de um maior número de informações. Nenhum caráter multiestado foi tratado como ordenado (aditivo). Quando comparados com caracteres utilizados em outros trabalhos sobre a morfologia de Sphingidae, as comparações encontram-se nos comentários dos caracteres em questão.

Para a edição da matriz de dados morfológicos foi utilizado o software Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2011). Estados foram codificados como ‘-’ quando não se aplicam a determinado táxon, estados de caracteres polimórficos foram reunidos com o sinal ‘&’, incerteza entre dois estados é representada por ‘/’ entre ambos e táxons com informações faltantes receberam o código ‘?’, conforme sugerido pelo programa. As análises da matriz morfológica foram realizadas no programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008). Foi adotado o método de busca tradicional, por se tratar de um pequeno conjunto de dados. O método de busca da nova tecnologia é indicado para matrizes de dados moleculares que frequentemente ultrapassam 1000 caracteres. A busca heurística com pesos iguais foi efetuada com o algoritmo de bissecção e reconexão de árvores (TBR), que avalia todas as possíveis combinações de subárvores não-enraizadas, com 10000 réplicas, 10 árvores salvas por réplica e *random seed* igual a zero. Os cálculos do bootstrap padrão com 1000 réplicas e do suporte de Bremer, com árvores subótimas até cinco passos a mais, foram realizados através do mesmo programa. Após a busca heurística com pesos iguais, foi realizada uma nova busca com pesagem implícita (Goloboff, 1993). Nas análises de pesagem implícita foi utilizado o *script propk* para a obtenção do valor de k que melhor se ajusta ao conjunto de dados. Este *script* calcula o melhor valor de k baseado no maior número de homoplasias observadas. Foram testados também os seguintes valores de k: 3, 5, 6, 7, 9, 12 e 15, para gerar um intervalo de confiança e analisar as possíveis variações. Os índices de consistência e de retenção dos caracteres foram calculados sobre a topologia obtida pela busca heurística com pesagem implícita.

Uma matriz de caracteres moleculares foi organizada através do software MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). Trechos de sequência faltantes foram codificados como '?' e sítios ambíguos como 'N'. Foi determinado o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explica as variações de cada marcador e do conjunto dos três marcadores. Após a determinação dos modelos, estes foram utilizados para a construção das árvores de Máxima Verossimilhança (ML) usando o mesmo programa. A consistência dos ramos foi estimada pelo procedimento de bootstrap não-paramétrico com 1000 repetições (Felsenstein, 1985). Na reconstrução filogenética com cada um dos marcadores separadamente foram testadas as diferenças entre análises com todos os sítios e com a eliminação completa da posição correspondente aos dados faltantes, que exclui da análise estes sítios em todas as sequências, gerando um conjunto de dados menor. A distância genética de cada marcador molecular foi estimada sob o melhor modelo de substituição de bases sugerido para cada um deles, usando padrões homogêneos de substituição entre as linhagens e eliminação par-a-par das posições com dados faltantes. Os modelos foram escolhidos usando o programa MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). Para a região do COI, os valores de distância foram obtidos através do modelo de distância-*p*, posto que o melhor modelo encontrado não estava entre as opções de cálculo do programa. Foram avaliadas, para os marcadores nucleares, as diferenças entre conjuntos de dados com vários terminais da mesma espécie e aqueles onde cada espécie é representada por uma sequência consenso criada no programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). A combinação dos três marcadores foi analisada pelos dois métodos de otimização: Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML). Em ambas, foi reduzido o número de terminais para a inclusão somente daqueles representados por mais de um marcador. Na análise de Máxima Parcimônia foi realizada a busca da nova tecnologia com combinações aleatórias dos algoritmos *Ratchet*, *Sectorial Search*, *Tree-fusing* e *Tree-drifting* e *random seed* igual a zero, usando o programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008). As demais configurações foram mantidas conforme o padrão do programa. Nesta análise, foi reduzido o número de terminais até que todos fossem representados, pelo menos, por CAD (850 pb) e mais um marcador. A estabilidade dos ramos foi determinada através do procedimento de bootstrap não-paramétrico. O suporte particionado de Bremer (1994) para cada uma das regiões sequenciadas foi obtido usando-se o *script pbsup* (Peña *et al.*, 2006).

Uma matriz de dados combinados contendo os três genes estudados (COI, CAD e *wingless*; 1900 pb) e 96 caracteres morfológicos foi usada para estimar uma topologia de Inferência Bayesiana no programa MrBayes versão 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Para a Inferência Bayesiana, foi utilizado um modelo evolutivo misto (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) para os três marcadores moleculares. O modelo morfológico considerou apenas o comprimento dos ramos e permitiu frequências variáveis dos estados, sob um modelo simétrico. Foram realizadas duas corridas com oito cadeias simultâneas para 10×10^6 gerações, amostrando árvores a cada 1000 ciclos. Conservativamente, os primeiros 25% das árvores foram descartados como “*burn-in*” e a distribuição da probabilidade posterior das árvores restantes foi estimada para inferir o suporte dos ramos. Caracteres polimórficos ou com codificação incerta, por não serem reconhecidos no programa, foram convertidos em novos estados para as análises. Assim, por exemplo, *A. pryeri*, que apresenta polimorfismo no caráter 23 com a entrada ‘0&2’ na matriz de caracteres morfológicos, passou a constituir um novo estado (23:3) na matriz de evidência total. Finalmente, o programa FigTree versão 1.3.1 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) foi usado para editar a topologia.

3. Resultados

3.1. Caracteres morfológicos

Foram levantados e codificados 96 caracteres de adultos. Treze caracteres foram obtidos da região da cabeça, 38 da região do tórax, sendo 10 das pernas e 25 das asas, 45 do abdômen, sendo 22 da genitália masculina e 11 da genitália feminina. Doze caracteres foram adaptados de Kitching (2002), embora outros, cujas variações foram descobertas de forma independente, sejam também analisados neste artigo e em Kitching (2003) para a tribo Acherontini e os gêneros relacionados a *Acherontia* [Laspeyres], respectivamente. Estes casos estão discriminados junto aos comentários na lista dos caracteres. Da mesma forma, alguns caracteres derivam das observações encontradas em Rothschild & Jordan (1903), com codificações apresentadas de forma inédita no presente trabalho.

A lista de caracteres é apresentada na seção Anexos.

3.2. Dados moleculares

Foram obtidas 32 sequências para o gene COI, sete para o gene CAD e seis para o gene *wingless* do banco de dados disponível no sítio do Genbank. Além delas, foram sequenciados 70 indivíduos para o fragmento do gene CAD, 133 indivíduos para o gene *wingless* e 138 indivíduos para o fragmento do gene COI. Fragmentos do gene COI foram os mais facilmente amplificados através do método utilizado.

O conjunto de dados formado por 77 sequências do gene CAD permitiu a análise filogenética de 14 dos 35 táxons selecionados. Este conjunto de dados abrange seis gêneros de Ambulycini. Comparando apenas estas sequências, são encontradas 257 variações em 859 sítios, sendo 24 não-sinônimas. Os maiores valores de distância genética encontrados foram entre *Cypa decolor* e cada um dos seis gêneros de Ambulycini (0,192 – 0,164). O menor valor foi 0,062, entre *Adhemarius* e *Orecta*.

Por sua vez, as 139 sequências de *wingless* analisadas totalizaram 13 dos 35 táxons selecionados. Foram detectadas 104 variações em 433 sítios, com nove mudanças não-sinônimas. Cinco gêneros de Ambulycini estão representados neste conjunto de dados. Neste caso, as maiores distâncias genéticas obtidas estão entre o gênero *Protambulyx* e cinco dos outros seis gêneros analisados, variando de 0,164 a 0,129. *Ambulyx* foi o gênero com menor distância genética em relação a *Protambulyx*, indicada por um valor de 0,105. Novamente, a menor distância genética entre gêneros obtida foi entre *Adhemarius* e *Orecta* (0,049).

Com relação às 171 sequências do gene COI, que representaram os 35 táxons, a maior distância genética foi encontrada entre *Akbesia* e *Trogolegnum* (0,136), seguida pelos pares *Akbesia-Compsulyx* e *Akbesia-Orecta*, com 0,129. Já as duas menores distâncias encontradas foram 0,075, entre *Compsulyx* e *Batocnema*, e 0,069, entre *Ambulyx* e *Batocnema*. A distância genética média entre os gêneros de Ambulycini foi 0,103 e dentro de cada gênero, *Protambulyx* teve o valor máximo, com 0,085, e *Orecta* o valor mínimo, com 0,015. Os pares de espécies que apresentaram o maior valor de distância foram *Akbesia davidi-Adhemarius gannascus* e *Protambulyx ockendeni-Adhemarius donysa*, com 0,147. Foram detectadas 236 variações em 658 sítios, com 19 mudanças não-sinônimas.

Entre os indivíduos de *A. eurysthene*s estudados, o maior valor de distância genética obtida para o fragmento do gene COI foi 0,017 e a distância genética média para a espécie foi 0,002.

3.3. Análise filogenética de Ambulycini

Analisando apenas o conjunto de dados morfológicos, após busca heurística com pesos iguais, foram obtidas duas árvores mais parcimoniosas com 301 passos (Figuras 1.3 e 1.4). Ambas as árvores encontradas apresentam uma tricotomia dentro do gênero *Protambulyx*, indicando o baixo poder de resolução do conjunto de dados levantado para o grupo composto por *P. ockendeni*, *P. euryalus* e outras quatro espécies do clado ((*P. sulphurea*, *P. eurycles*), (*P. goeldii* e *P. astygonus*)), doravante designado por SEGA. A única diferença entre as árvores consiste em duas combinações distintas para o grupo formado por *Ambulyx wildei*, *A. pryeri* e *A. substrigilis*, dentro do grupo monofilético formado pelas cinco espécies analisadas para o gênero. Assim, a árvore com a configuração (*A. pryeri*, (*A. substrigilis*, *A. wildei*)) será trata como A1 (Figura 1.3) e a com (*A. wildei*, (*A. substrigilis*, *A. pryeri*)), como A2 (Figura 1.4). O agrupamento de todos os representantes da tribo e *Daphnusa ailanti* teve um suporte de Bremer igual a 4, indicando que árvores parcimoniosas com quatro passos a mais apresentam topologias distintas com relação a este nó.

Ambulycini forma um grupo monofilético fracamente sustentado pelo conjunto de dados morfológicos. *Barbourion lemai* é o táxon-irmão dos demais Ambulycini e o nó que define o compartilhamento de um ancestral comum com o restante da tribo apresenta baixa consistência pelo valor de bootstrap e pelo suporte de Bremer. Em contrapartida, o nó seguinte reunindo todos os demais Ambulycini possui elevada estabilidade, com bootstrap igual a 95%. Por esta razão, este grupo será tratado daqui em diante como Ambulycini *sensu stricto*.

Com exceção de *Adhemarius*, todos os gêneros não-monotípicos formam grupos monofiléticos nestas topologias. *Trogolegnum pseudambulyx* aparece como grupo-irmão de *A. donysa* e *A. dariensis* dentro do grupo formado por todos os táxons analisados para o gênero *Adhemarius*, resultando na parafilia deste último. O clado formado pelas espécies de *Ambulyx* apresenta um valor elevado de bootstrap, mas um suporte de Bremer nas duas árvores de apenas um passo. *Protambulyx* forma um grupo fortemente sustentado pelas duas medidas e, igualmente, *Orecta* apresenta alta consistência. Por outro lado, *Batocnema* e *Adhemarius* apresentam valores críticos de consistência nas duas árvores de menor comprimento para o conjunto de dados morfológicos.

Para a busca heurística com pesagem implícita dos caracteres foram obtidos dois valores de k , 4,0625 e 4,7656, em todas as vezes que foi rodado o *script propk* (Figura 1.5). Com $k = 3$, o grupo formado por (*T. pseudambulyx*, (*A. donysa*, *A. dariensis*)) é apresentado como grupo-irmão de (*Orecta*, (demais *Adhemarius*)). Até $k = 7$, todas as topologias foram idênticas àquela obtida para o k estimado. Entre os valores de 9 a 15, a única diferença apresentada consiste no posicionamento de *A. japonica* e *A. schauffelbergeri*, idêntico ao observado em A1 e A2. As medidas de *fit* (número de vezes em que se obtém o menor número de passos) de cada k variaram de 28,9, para o menor valor, a 9,6, para $k = 15$. Na topologia de busca com pesagem usando o k estimado, foram encontradas apenas duas diferenças em relação às árvores mais parcimoniosas com pesos iguais: a fixação do grupo (*A. pryeri*, (*A. substrigilis*, *A. wildei*)) e o agrupamento de *A. japonica* com *A. schauffelbergeri* formando um clado. Esta topologia será tratada como A3.

Para o mapeamento dos caracteres e estudo das sinapomorfias morfológicas foi escolhida a topologia de A3 (Figura 1.5), uma vez que é muito semelhante a A1 e a única diferença apresentada é congruente com algumas topologias obtidas através dos dados moleculares (ver adiante). Além disso, acredita-se que a metodologia que agrega mais peso aos caracteres com menos homoplasias (pesagem implícita), seja a mais adequada para estimar a história evolutiva de um grupo (Goloboff *et al.*, 2008a). Sendo assim, os cálculos dos índices de consistência e de retenção dos caracteres respeitam a configuração de A3. Não obstante, serão apresentadas as diferenças de mapeamento em cada árvore.

Levando em consideração as três topologias, Ambulycini pode ser dividida em oito linhagens pelo conjunto de dados morfológicos, daqui em diante designadas como nós internos 1 – 8 (Figura 1.2).

Figura 1.2. Topologia representando as relações filogenéticas entre os gêneros de Ambulycini, obtida com os dados morfológicos. Barras horizontais indicam os principais nós com seus respectivos rótulos. Triângulo preto invertido representa ramos colapsados.

O grupo que reúne *Daphnusa aйлanti* e todos os Ambulycini é sustentado por cinco sinapomorfias. Já com relação à tribo, quatro sinapomorfias sustentam o nó interno 1, seis o nó interno 2, três o nó interno 3, duas o nó interno 4, duas o nó interno 5, uma o nó interno 6, três o nó interno 7, mas nenhuma apomorfia entre os caracteres levantados é compartilhada exclusivamente pelo nó interno 8. Entre os gêneros monofiléticos de Ambulycini, apenas *Ambulyx* e *Orecta* são sustentados por sinapomorfias, três e duas, respectivamente. *Akbesia davidi* e *Compsulyx cochereaui*, dois gêneros monotípicos, formam um clado com o compartilhamento exclusivo de uma vesica com dois divertículos (82:2), embora sejam espécies com distribuição geográfica discrepante. *Ambulyx japonica* e *A. schauffelbergeri* são agrupadas pela presença de manchas laterais no abdômen (31:1) em A3, ao passo que as homoplasias 43:1 e 79:1 aproximam *A. schauffelbergeri* de (*A. pryeri*, (*A. substrigilis*, *A. wildei*))

em A1 e A2. Dentro do gênero *Protambulyx*, o clado (*P. strigilis*, *P. carteri*) é grupo-irmão de todos os demais. O clado (*P. euryalus*, *P. ockendeni*, (SEGA)) é sustentado pela sinapomorfia 41:1, enquanto (*P. eurycles*, *P. sulphurea*) são os únicos a apresentar o estado 76:1. Em *Orecta*, o caráter 10:0 é sinapomorfia de (*O. lycidas lycidas*, *O. lycidas eos*). Finalmente, os grupos de *Adhemarius* sustentados por sinapomorfias foram: (*A. donysa*, *A. dariensis*) por 2:1, 5:2 e 40:2 e (*A. daphne*, *A. gannascus*) por 38:2.

O melhor modelo encontrado para a partição de COI, ao tratar os dados faltantes com a eliminação completa do caráter, foi T92 com os parâmetros de distribuição Gamma e sítios invariáveis. O modelo T92 atribui diferentes pesos a transversões e transições (mudanças específicas de bases nitrogenadas) (Tamura, 1992). Com exceção de *Protambulyx* e *Adhemarius*, todos os gêneros resultaram em grupos monofiléticos (Figura S2). Segundo essa análise, *Compsulyx*, *Batocnema*, *Amphypterus*, *Ambulyx*, *Protambulyx* e *Akbesia* formam uma linhagem distinta dos demais terminais. *Compsulyx cochereaui* é grupo-irmão de todos os demais e *Akbesia davidi* está inserida dentro do clado que reúne todas as espécies de *Protambulyx*. Com um valor de bootstrap de 78,5, o grupo (*T. pseudambulyx*, (*A. donysa*, *A. dariensis*)) é uma das poucas congruências entre esta e as topologias baseadas em caracteres morfológicos. Foi ainda obtida uma árvore sem as espécies do grupo externo para diminuir o efeito das homoplasias sobre a análise e esta encontra-se na Figura S3. Nesta nova análise, as parafilias de *Protambulyx* e *Adhemarius* persistiram, porém *Compsulyx cochereaui* passou a ser grupo-irmão da linhagem composta por *Adhemarius* spp., *Trogolegnum pseudambulyx* e *Orecta* spp., ao passo que a linhagem oposta se manteve inalterada, exceto pela ausência de *C. cochereaui*. Na interpretação do posicionamento de *Akbesia davidi* deve ser levado em conta que a sequência disponível no GenBank possui apenas 286 pb.

As análises com as partições CAD e *wingless* tiveram drástica redução no número de táxons utilizados. Na análise de 11 táxons do grupo interno e dois do grupo externo para o marcador *wingless* (Figura S5) foi obtido o modelo T92 permitindo sítios invariáveis. Na topologia resultante com ML, todos os gêneros representados por mais de uma espécie formaram grupos monofiléticos. *Amphypterus panopus* aparece como táxon-irmão de (*Orecta lycidas*, (*Adhemarius* spp.)) em concordância com as topologias baseadas em marcadores morfológicos. Em *Adhemarius*, *A. palmeri* e *A.*

*eurysthene*s formam o clado irmão de (*A. daphne*, (*A. gagarini*, *A. gannascus*)), o primeiro com um valor moderado de bootstrap (76,1), enquanto o último com grande suporte (92,5). Dentro de *Protambulyx*, *P. euryalus* forma um clado com *P. eurycles*, com suporte significativo. Na análise sem o grupo externo (não representada), a topologia da árvore para os táxons de Ambulycini se manteve igual, apenas foram eliminados os ramos que correspondiam a *Parum colligata* e *Cypa decolor*.

A análise da partição CAD pelo método ML (Figura S4) originou um resultado mais conservativo em relação aos resultados da análise morfológica, apesar de ter apenas um táxon a mais do que a partição *wingless*. Neste caso, o melhor modelo obtido foi T92 com o parâmetro de distribuição Gamma. Aqui, os táxons de Ambulycini representados formam um grupo monofilético. *Ambulyx schauffelbergeri* aparece como táxon-irmão de todos os demais. Os gêneros *Adhemarius* e *Protambulyx*, os únicos com mais de uma espécie na análise, formam grupos monofiléticos. Todos os táxons neotropicais são agrupados em um clado e, novamente, a topologia (*Orecta lycidas*, (*Adhemarius* spp.)) é apresentada. Apesar da posição mais externa de *Batocnema*, o agrupamento dos gêneros *Amphypterus*, *Protambulyx*, *Orecta* e *Adhemarius* é congruente com aquele obtido pelos marcadores morfológicos, embora o clado (*A. gagarini*, *A. daphne*) seja ainda uma divergência entre as duas topologias.

A combinação dos três marcadores analisada pelo método de Máxima Parcimônia (MP) levou à obtenção de sete árvores mais parcimoniosas, cujas diferenças principais estão no posicionamento entre os terminais (indivíduos) de *Adhemarius eurysthene*s. Outra variação consiste no deslocamento de *Batocnema africanus*, que ora forma um clado com o gênero *Protambulyx*, ora aparece como táxon-irmão de (*Protambulyx*, (*Amphypterus*, (*Orecta*, (*Adhemarius*))))). Apesar da topologia dentro do nó interno 2 apresentar alterações marcantes em relação a A1-3, todos os gêneros se mantiveram monofiléticos. *Amphypterus panopus*, nesta análise, é a espécie-irmã do clado (*Orecta lycidas*, (*Adhemarius* spp.)), porém o suporte para esta configuração é consideravelmente baixo (bootstrap igual a 25). Entre as três espécies de *Protambulyx*, *P. euryalus* e *P. eurycles* aparecem como espécies-irmãs. Na Figura 1.9 podem ser observadas as contribuições de cada marcador pelos valores do suporte particionado de Bremer.

O método de Máxima Verossimilhança (ML) apresenta essencialmente o mesmo resultado quando são usadas as sequências consenso para os terminais e o

modelo GTR com a taxa de heterogeneidade através dos sítios modelada de acordo com uma distribuição Gamma (Figura 1.10). Entretanto, não há a variação no posicionamento de *Batocnema africanus*. Em ML com as sequências consenso das espécies, a única árvore recuperada contempla o grupo formado por (*Batocnema africanus*, (*Protambulyx* spp.)). Esta será referida como A4 no restante do texto. Por outro lado, quando é usado o mesmo conjunto de dados da análise de MP, isto é, com todas as sequências de cada espécie, foi obtido o modelo TN93 com distribuição Gamma, e o resultado gerado envolve incongruências como o posicionamento de *Parum colligata* entre os ramos de Ambulycini e baixos valores de bootstrap para os nós mais internos (Figura 1.11).

Finalmente, foi obtida uma árvore de evidência total (marcadores morfológicos e moleculares combinados) com o método de Inferência Bayesiana (IB), que será designada por At daqui em diante (Figura 1.7). Nesta análise, foram recuperados os nós internos 1, 2 e 3, com elevados valores de probabilidade posterior dos ramos (0,89, 1 e 0,97, respectivamente). O nó que corresponde ao conjunto de táxons do nó interno 4 apresenta uma estabilidade apenas moderada (0,6) e divide os demais Ambulycini em duas linhagens, ambas com alta consistência nos ramos, cujas combinações diferem significativamente das árvores morfológicas. Uma das linhagens compreende todos os táxons estudados para o gênero *Adhemarius*, as duas espécies de *Orecta* e *T. pseudambulyx* (doravante tratada por ademariformes). Entretanto, desta vez o clado (*A. sexoculata*, *A. tigrina*) é apresentado como grupo-irmão da tricotomia formada por *Orecta* spp., (*T. pseudambulyx*, (*A. donysa*, *A. dariensis*)) e as demais espécies de *Adhemarius*. *Adhemarius daphne*, *A. gagarini* e *A. gannascus* têm a mesma configuração encontrada em A4 e novamente estão intimamente relacionadas às espécies-irmãs *A. eurysthenes* e *A. palmeri*. Com exceção de *Adhemarius*, mais uma vez todos os gêneros formam grupos monofiléticos. A outra linhagem tem *Compsulyx cochereaui* como o táxon-irmão dos demais, enquanto que *Batocnema africanus* e *B. cocquerelii*, por sua vez, formam o grupo-irmão de (*Protambulyx* spp., *Akbesia davidi*) (daqui em diante também chamada de ‘prakcoba’). O posicionamento de *P. euryalus* e *P. ockendeni* é resolvido e as duas formam um clado. Aqui, este clado é irmão de *P. eurycles* e *P. sulphurea* com uma moderada probabilidade posterior. No mais, *Protambulyx* mantém a mesma configuração mostrada pelas outras análises. *Ambulyx* apresenta a mesma topologia encontrada em A3.

Figura 1.3. Árvore mais parcimoniosa 1 (A1) baseada em caracteres morfológicos, recuperada por busca heurística com pesos iguais. Valores rotulados abaixo dos ramos indicam o bootstrap padrão à esquerda da barra e o suporte de Bremer à direita. Comprimento da árvore (L) = 301; Índice de consistência total (Ci) = 42; Índice de retenção total (Ri) = 73.

Figura 1.4. Árvore mais parcimoniosa 2 (A2) baseada em caracteres morfológicos, recuperada por busca heurística com pesos iguais. Valores rotulados abaixo dos ramos indicam o bootstrap padrão à esquerda da barra e o suporte de Bremer à direita. L = 301; Ci = 42; Ri = 73 (abreviações conforme Figura 1.3).

Figura 1.5. Árvore de Máxima Parcimônia com pesagem implícita (A3) baseada em caracteres morfológicos. K = 4,0625; L = 302; Ci = 42; Ri = 73 (abreviações conforme Figura 1.3).

Figura 1.6. Árvore de Máxima Parcimônia com pesagem implícita (A3) mostrando a distribuição dos caracteres. Círculos vazios indicam estados homoplásticos e círculos cheios, apomorfias exclusivas dos ramos.

Figura 1.7. Árvore de Inferência Bayesiana para os conjuntos de dados morfológicos e moleculares combinados (evidência total – At). Valores de probabilidade posterior indicados acima de cada ramo. Em destaque, os nós correspondentes àqueles da Figura 1.2. NI = nó interno.

Figura 1.8. Uma das sete árvores mais parcimoniosas da análise dos três marcadores moleculares combinados. Valores abaixo dos ramos indicam o bootstrap padrão. Códigos ao lado das espécies conforme Tabelas 1.1 e 1.5.

Figura 1.9. Árvore de consenso estrito das árvores mais parcimoniosas obtidas na análise dos três marcadores moleculares combinados. Valores abaixo dos ramos indicam o suporte particionado de Bremer das partições COI, CAD e *wingless*, respectivamente, e acima, o bootstrap padrão. Códigos ao lado das espécies conforme Tabelas 1.1 e 1.5.

Figura 1.10. Árvore de Máxima Verossimilhança dos três marcadores moleculares combinados com as sequências consenso para as espécies. Acima dos ramos é indicado o bootstrap padrão.

Figura 1.11. Árvore de Máxima Verossimilhança dos três marcadores moleculares combinados. Acima dos ramos é indicado o bootstrap padrão. Triângulos pretos representam ramos colapsados.

4. Discussão

4.1. Contribuições morfológicas e moleculares na reconstrução filogenética de Ambulycini

Das 39 sinapomorfias encontradas em Ambulycini, 34 são homoplasias nas hipóteses filogenéticas mais abrangentes de Sphingidae. Do mesmo modo, nenhuma das quatro sinapomorfias da tribo (nó interno 1) apresentaria a mesma consistência em análises que incluíssem representantes de outras tribos (e.g. caráter 1:0). Um tipo particular de fenda na base do cremaster é, ainda, a única sinpomorfa apontada na literatura para Ambulycini e é resultado dos trabalhos de Nakamura (1977) com os

Sphingidae do Japão (*apud* Kawahara *et al.*, 2009). Infelizmente, dados detalhados da morfologia de imaturos, especialmente para as espécies neotropicais, são escassos e não foram avaliados no presente trabalho. Assim, a única possível sinapomorfia conhecida não pôde ser testada. Apesar de não ter sido encontrada nenhuma nova sinapomorfia para a tribo, os caracteres analisados tiveram um grau de resolução considerado aceitável para o conjunto de dados estudado.

A grande frequência de homoplasias é o motivo da principal dificuldade em se obter caracteres morfológicos consistentes para estudos sistemáticos abrangentes em Sphingidae e em diversos grupos de animais e plantas (Givnish & Sytsma, 1997). Rothschild & Jordan (1903) citam alguns casos em que grupos de espécie aceitos ainda hoje não podem ser definidos por uma característica exclusiva, mas somente pelo conjunto de algumas características total ou parcialmente presente em seus representantes. Outra dificuldade consiste em traduzir as diferenças observadas em caracteres que sejam independentes e com estados mutuamente exclusivos, dificuldade esta encontrada em qualquer grupo de organismos (Serenó, 2007). O uso de ferramentas analíticas como a morfometria, por exemplo, em trabalhos futuros, poderia ajudar a contornar esse último problema.

A partição morfológica analisada por MP através dos dois regimes de ponderação corrobora a monofilia de Ambulycini, apesar dos baixos valores de bootstrap encontrados para o nó interno 1. Pelas características morfológicas estudadas, *Barbourion lemai* é o grupo-irmão da tribo, indicando se tratar de um organismo apropriado para o enraizamento de hipóteses filogenéticas sobre o grupo. Todavia, devido à baixa estabilidade do clado nas filogenias morfológicas e à lacuna de informações moleculares que suportem o posicionamento de *B. lemai* obtido neste trabalho, optou-se pelo termo Ambulycini *sensu stricto* para designar o nó subsequente.

Aparentemente, seis características têm presença singular na filogenia de Ambulycini. O ramo do nó interno 2, também sustentado pela presença de uma crista transversa de escamas entre as antenas, reúne os únicos Sphingidae com essa característica. Assim, o caráter 3:1 pode ser considerado uma sinapomorfia de Ambulycini *sensu stricto*. Também não foi encontrada nenhuma referência à convergência das veias R5 e M1 em *Protambulyx* (41:1) em outra espécie de Sphingidae na literatura. Porém, dada a variedade de modificações na venação das asas de Lepidoptera, é possível que esta não seja a única linhagem a apresentar este estado. Do mesmo modo, a presença de uma mancha esbranquiçada no ápice do fêmur médio

(20:1) no ramo do nó interno 6, não foi extensivamente investigada entre os Sphingidae. Portanto, a interpretação dessa característica como uma sinapomorfia não passa de uma suposição. Escamas da cortina estridulatória em forma de foice e com o ápice acoplado (38:0), embora seja um caráter homoplástico em A1, A2 e A3 por estar presente em *Protambulyx* e *Batocnema*, também não apresenta nenhum correspondente na filogenia de Sphingidae registrado na literatura. Rothschild & Jordan (1903) apontam a presença de cortinas de escamas rígidas em outros táxons externos a Ambulycini, entretanto, não foi investigada a presença de ápices acoplados nessas estruturas. Por último, a presença de uma borda de escamas esbranquiçadas delimitando a mancha subapical nas asas anteriores (51:1) e machos com oitavo tergito totalmente coberto por uma mancha escura (34:1), contrastando com o a coloração predominante do restante do abdômen, são outras duas características que só puderam ser observadas em alguns representantes de Ambulycini. Embora seu registro também não tenha sido extensivamente investigado entre os Sphingidae, essas características têm grande probabilidade de apresentarem correspondentes em outros ramos da filogenia da família, posto o grande número de homoplasias entre as características de coloração.

As análises da partição morfológica resultaram no agrupamento improvável de *A. davidi* e *C. cochereaui* em um clado, o que é também sugerido pelos baixos suportes encontrados. Apesar de serem as únicas espécies de Ambulycini com apenas dois divertículos na vesica (82:2), essa aproximação deve ser vista com cautela. Por outro lado, o maior parentesco destes táxons e de *Batocnema* spp. com a linhagem de *Adhemarius*, *Orecta* e *Trogolegnum* (nó interno 5) obtido pelos dados morfológicos não é absurdo. Em favor disso, estão as transformações morfológicas com aparentemente elevado sinal filogenético como: a indiferenciação do último artigo antenal (12:1), a redução da mancha discal (54:0) e a presença de uma mancha esbranquiçada no ápice do fêmur médio (20:1).

O conjunto de dados morfológicos levantado não resolveu os relacionamentos de *P. euryalus* e *P. ockendeni* no grupo formado por todas as espécies descritas de *Protambulyx*. Uma possível explicação para o fato é a diminuta série de exemplares de *P. ockendeni* acessíveis para este estudo (ver Tabela 1.7).

Na utilização de caracteres moleculares, espera-se um menor grau de subjetividade. Entretanto, o indiscriminado acúmulo de homoplasias pode resultar em hipóteses de relacionamento de difícil interpretação biológica. COI é um marcador apropriado para resolver as relações de nós mais recentes, cuja alta taxa de mutações

pode confundir os relacionamentos mais antigos (Brower *et al.*, 2006; Silva-Brandão *et al.*, 2008, 2009). Por outro lado, o reduzido conjunto de sequências de CAD e *wingless* neste trabalho redundou em uma limitada contribuição desses marcadores para a sistemática dos gêneros de Ambulycini. Nas três análises, *Adhemarius*, *Trogolegnum* e *Orecta* formam uma linhagem. Apenas em CAD, *Protambulyx* aparece explicitamente como grupo-irmão desta linhagem, apesar do baixo valor de bootstrap obtido. A monofilia das espécies neotropicais recuperada em CAD está de acordo com a topologia encontrada por Kawahara *et al.* (2009) para cinco marcadores do DNA nuclear. Porém, essa configuração não é repetida em nenhuma das outras topologias obtidas aqui. No trabalho conduzido por Kawahara *et al.* (2009), CAD foi a maior sequência utilizada, equivalendo a quase duas vezes e meia o tamanho do segundo maior (DDC), e analisado isoladamente suportou 13 dos 20 nós focados por apresentarem maior estabilidade (bootstrap maior que 88). Apesar de obterem dados pelos dois métodos de otimização (ML e MP), os resultados das análises de parcimônia evidenciaram o artefato de atração dos ramos longos e suas topologias foram ignoradas (Kawahara *et al.*, 2009). Cabe ressaltar também que o modelo de substituição de nucleotídeos utilizado pelos autores nas análises de máxima verossimilhança (GTR com distribuição Gamma e permissão de sítios invariáveis) foi diferente do modelo adotado para o conjunto de dados do gene CAD no presente trabalho. Assim, algumas dessas diferenças podem ser o reflexo das pressuposições de cada modelo.

4.2. Evidência total e a polifilia de *Adhemarius*

Embora os agrupamentos taxonômicos tenham sido corroborados em nove dos 10 gêneros de Ambulycini, todas as topologias encontradas que incluem *T. pseudambulyx*, *A. donysa* e *A. dariensis* evidenciaram a necessidade de revisão do gênero *Adhemarius*. Além disso, *A. tigrina* e *A. sexoculata*, ao formarem o grupo-irmão dos demais táxons dessa linhagem (*Orecta* spp., *T. pseudambulyx* e as demais espécies de *Adhemarius*) na topologia de At, correspondem a outro problema taxonômico. Neste trabalho, At é adotada como a topologia que melhor traduz a história filogenética da tribo e, sendo assim, *Adhemarius* é considerado gênero válido apenas para o grupo formado por (*A. ypsilon*, (*A. eurysthene*s, *A. palmeri*), (*A. gannascus* (*A. daphne*, *A. gagarini*))), incluindo a espécie tipo do gênero (*A. gannascus*), doravante designado *Adhemarius sensu stricto*. Considerando as grandes diferenças morfológicas entre as espécies agora retiradas de *Adhemarius*, acredita-se que uma nova classificação deva

dividir este gênero em três, criando ao menos um gênero novo. Propõe-se, desse modo, que *A. donysa* e *A. dariensis* sejam transferidas para o gênero *Trogolegnum*, que então deixa de ser um gênero monotípico. No entanto, para atingir este objetivo deveriam ser estudadas todas as espécies do complexo *A. dariensis*, posto que este possui ao todo cinco espécies: *A. dariensis*, *A. donysa*, *A. mexicanus* Balcázar & Beutelspacher, 2001, *A. blanchardorum* (Hodges, 1985) e *A. globifer* (Dyar, 1912). A delimitação taxonômica dos gêneros da tribo Ambulycini vai além do escopo deste trabalho e, portanto, estas são apenas indicações de trabalhos futuros, com ênfase na redescritção dos gêneros e delimitação de suas espécies. Outra alteração necessária seria criar um gênero novo para incluir *A. tigrina* e *A. sexoculata*, tanto pelas topologias de A1-3, quanto pelas topologias de COI e At. Estas são as únicas espécies descritas de *Adhemarius* com uma coloração de fundo amarela na face dorsal das asas posteriores e, se adotada a hipótese filogenética presente em At, a coloração da asa posterior se mostra uma característica importante na distinção de linhagens dentro de Ambulycini.

4.3. A monofilia de *Adhemarius eurysthenes*

Os dados moleculares obtidos neste trabalho demonstram elevado suporte para a monofilia de *Adhemarius eurysthenes* (Figuras 1.9 e 1.11). Tanto as árvores do gene COI com várias espécies de *Adhemarius* quanto aquelas dos demais marcadores agruparam todos os indivíduos de *A. eurysthenes*, mesmo aqueles de clusters mais isolados do Espírito Santo (ARES) e do Rio Turvo (RTSP), com elevados valores de bootstrap. Por outro lado, a distância genética média dentro de *Adhemarius sensu stricto* calculada para o marcador COI, foi 0,049, ao passo que entre *A. eurysthenes* e sua espécie-irmã, *A. palmeri*, essa medida cai para 0,041, mais do que duas vezes a maior distância encontrada entre dois indivíduos de *A. eurysthenes* (0,017). Apesar de clusters de indivíduos de *A. eurysthenes* terem sido recuperados por variados conjuntos de dados e métodos de análises, o maior valor de distância genética entre dois indivíduos desta espécie é ainda menor do que aqueles para pares de outras espécies da Região Neotropical (*A. gagarini* com 0,018 e, *A. gannascus*, até 0,023). O valor é também bastante baixo quando comparado com dados para borboletas, onde distâncias genéticas de até 0,044 foram encontradas para espécies de *Hermeuptychia* (Nymphalidae: Satyrinae: Euptychiina) (Seraphim *et al.*, 2014). Ademais, a presença de alguns indivíduos de *A. eurysthenes* do Espírito Santo em outros clados nas

topologias pode ser um indicativo de intercâmbio genético persistente entre esta e outras populações.

A sequência barcode tem sido largamente utilizada para estudos de delimitação de espécies (Silva-Brandão, 2009, Seraphim *et al.*, 2014). Novos conceitos de espécie incorporando essa tecnologia foram criados em resposta à demanda taxonômica e ainda nenhum consenso está estabelecido (Mallet, 2005). Os resultados obtidos neste estudo permitem que todas as populações amostradas sejam tratadas como uma linhagem coesa com potencial de inter cruzamento. Por esta razão, será mantida a designação de *Adhemarius eurysthenes* para todas as populações analisadas, mesmo para aqueles indivíduos de clusters mais isolados como os *A. eurysthenes* ARES16, ARES10 e ARES2, evitando, assim, uma inflação taxonômica (DeSalle *et al.*, 2005). Dessa forma, estudos filogeográficos dessas populações podem ser seguramente relacionados a uma unidade evolucionária independente.

4.4. Implicações biológicas e biogeográficas da hipótese adotada

Ao considerar a topologia de At como a hipótese que melhor representa o relacionamento entre o conjunto de táxons analisados, especula-se que as larvas do ancestral de Ambulycini eram polípagas (ver Figura 1.12). Em algum momento na sua história evolutiva, a linhagem que reúne *Amplypterus* e as duas linhagens com táxons neotropicais especializou-se em Anacardiaceae. Posteriormente, as larvas na linhagem dos ademariformes especializaram-se em Lauraceae. Na fauna da Índia, Sri Lanka e Myanmar, apenas larvas de Ambulycini se alimentam de Anacardiaceae (Bell & Scott, 1937), ao passo que Lauraceae é planta hospedeira de larvas de Sphingini e Smerinthini (Pittaway, 2015). O fato de Anacardiaceae ser a planta hospedeira mais comum entre as larvas de *Protambulyx* também sugere que os Ambulycini neotropicais não formam uma única linhagem. Por outro lado, a especialização das larvas em se alimentarem de Lauraceae pode, então, ter surgido uma única vez na filogenia da tribo e, a utilização de espécies neotropicais dessa família de plantas pode ser entendida como uma sinapomorfia da linhagem dos ademariformes.

Kitching & Cadiou (2000), embora sem lançar mão de métodos de otimização para uma análise formal de uma matriz de caracteres morfológicos, previram uma configuração que é corroborada aqui pelo nó que separa as linhagens compostas por *Protambulyx* spp., *A. davidi*, *C. cochereaui* e *Batocnema* spp. ('prakcoba') de um lado e *Orecta* spp., *T. pseudambulyx* e *Adhemarius* spp. do outro, e não é contradita pelos

nós subsequentes, uma vez que a proposta apresentada pelos autores não resolve os relacionamentos internos a este clado. Por conseguinte, a parte da previsão que supõe a merofilia das espécies do Velho Mundo, contradizendo os resultados de Kawahara *et al.* (2009), é também corroborada no presente trabalho. Os táxons que hoje habitam a Região Neotropical representam duas linhagens distintas: os ademariformes (*Orecta* spp., *T. pseudambulyx* e *Adhemarius* spp.), geograficamente mais homogênea, e ‘prakcoba’, morfológica- e geograficamente heterogênea, representada na Região Neotropical por *Protambulyx*, mas com representantes desde o Oriente Médio (Paleártico) à África (Afrotropical) e Nova Caledônia (Indo-Australiana) (ver Tabela 1.9). Assim, os resultados obtidos indicam que a história evolutiva das espécies neotropicais envolve divergências provavelmente mais antigas do que o processo de formação da Região Neotropical.

Em Ambulycini, os registros de *Protambulyx carteri* Rothschild & Jordan, 1903 e *P. strigilis* (espécies sinonimizadas por Tuttle (2007), mas implicitamente restabelecidas por Heppner (2008) (Oehlke, 2000; Kitching, 2015)) para a Flórida e, de *Adhemarius blanchardorum*, para o Texas, nas proximidades da fronteira com o México, sugerem uma colonização tardia da América do Norte, posto que estes são os limites setentrionais da distribuição Neotropical da tribo.

Figura 1.12. Hipótese filogenética de Ambulycini mostrando a evolução do hábito alimentar das larvas. Em destaque, as duas linhagens com espécies neotropicais (ademariformes em verde). As quatro linhagens de ademariformes estão separadas por cores: em vermelho, *Adhemarius sensu stricto*.

5. Conclusão

Ambulycini é mais uma vez corroborada como grupo monofilético, porém, o uso de todos os gêneros elencados pela classificação atual é inédito, atribuindo maior confiabilidade aos resultados aqui obtidos. Dentro de Ambulycini, *Barbourion lemaii* é o táxon-irmão de todos os demais. Com exceção de *Adhemarius*, todos os demais gêneros são monofiléticos. *Ambulyx* foi o gênero com maior consistência de ramo em todas as análises, tanto morfológicas quanto moleculares e de evidência total. Os gêneros do Velho Mundo não formam um grupo monofilético por um robusto conjunto de evidências. Por outro lado, as espécies neotropicais estão separadas em duas linhagens com histórias evolutivas distintas. A linhagem de *Adhemarius*, *Orecta* e *Trogolegnum* aparentemente reúne todos o Ambulycini cujas larvas se alimentam de Lauraceae.

Adhemarius é um gênero polifilético cuja revisão taxonômica se faz necessária. As cinco espécies do complexo *dariensis* devem ser estudadas para se testar a ancestralidade comum exclusiva com *T. pseudambulyx*. Caso confirmada, deve-se realizar a revisão do gênero *Trogolegnum*. *Adhemarius tigrina* e *A. sexoculata* formam o clado-irmão do grupo que reúne *Orecta* spp., *T. pseudambulyx* e *Adhemarius* spp. e deveriam compor um gênero novo.

A inclusão de 109 indivíduos de *Adhemarius eurysthene*s de 10 localidades diferentes nas análises filogenéticas com os marcadores moleculares resultou na recuperação de um grupo coeso, isto é, com pouca diferenciação genética interna. Com isso, obteve-se uma hipótese segura para a manutenção do status taxonômico dessas populações.

A única sinapomorfia morfológica conhecida de Ambulycini, embora ainda não extensivamente investigada, provém do estágio de pupa, indicando a grande importância dos caracteres das formas imaturas para a elucidação de sistemática de Sphingidae. Contribuir para o conhecimento deste ramo tão pouco explorado da história evolutiva dos esfingídeos de um modo geral é dar um grande avanço em direção ao entendimento sistemático, taxonômico e evolutivo. Na medida em que novas informações sejam acumuladas, será possível testar as hipóteses aqui aventadas.

Anexos

Lista de caracteres morfológicos

l = número de passos do caráter; ci = índice de consistência; ri = índice de retenção.

Cabeça

1. Maxilas, gáleas (Figura 1.13):

(0) acopladas, com cerdas de acoplamento fundidas

(1) separadas, com cerdas de acoplamento livres

Comentário:

Bastante comum em Smerinthinae, o aparelho bucal reduzido é o estado plesiomórfico para Sphingidae (Kitching & Cadiou, 2000; Kawahara, 2007). Este caráter é aqui utilizado pois gáleas acopladas são distinguíveis em todos os representantes de Ambulycini e não estão presentes nos exemplares escolhidos como grupo externo. (l = 1; ci = 100; ri = 100).

Figura 1.13. Probóscide. A. *Daphnusa ailanti*; B. *Cypa decolor*; C. *Ambulyx pryeri*.

2. Frontoclípeo, escamas, coloração (Figura 1.14):

(0) uniforme

(1) em gradiente com mais de um tom

(2) duas faixas de coloração distintas

Comentário:

A presença de ao menos uma cor na região do frontoclípeo por vezes marcadamente distinta da região dorsal da cabeça, entre o vértice e o occipício, é uma característica que agrupa todos os Ambulycini menos *Barbourion lemai*, segundo a topologia adotada (Figura 1.5). Este caráter trata apenas das variações de coloração encontradas

para evitar que o contingenciamento dos estados pudesse gerar homoplasias. (l = 4; ci = 50; ri = 86)

Figura 1.14. Cabeça em vista frontal. A. *Ambulyx pryeri*; B. *Protambulyx goeldii*; C. *Adhemarius dariensis*; D. *Orecta lycidas*.

3. Frontoclípeo e vértice, crista transversal formada pelo encontro das escamas (Figura 1.14):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Rothschild & Jordan (1903) mapearam esta característica em seu diagrama de relacionamento. Na topologia adotada (Figura), a crista formada pelo encontro das escamas da região do vértice, projetadas anteriormente, com aquelas da região do frontoclípeo é uma sinapomorfia que efetivamente reúne todos os Ambulycini menos *Barbourion lemaii*. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

4. Palpo labial, último artículo, razão entre comprimento e largura:

(0) mais comprido do que largo

(1) tão comprido quanto largo

Comentário:

Variações na proporção entre o comprimento e a largura do último artigo do palpo labial mostrou-se bastante variável dentro do gênero *Ambulyx*. Conforme a topologia adotada, o estado 4:1 apesar de homoplástico, reúne os gêneros *Adhemarius*, *Akbesia*, *Batocnema*, *Compsulyx*, *Orecta* e *Trogolegnum*. (l = 5; ci = 20; ri = 63)

Figura 1.15. Palpo labial. Acima, segundo e terceiro palpômeros de *A. davidi*. Seta indica o órgão de Von Rath. Abaixo, segundo e terceiro segmentos dos palpos labiais de *A. dariensis* (A), *A. eurysthenes* (B) e *P. strigilis* (C).

5. Palpo labial, último artículo, formato (Figura 1.15A-15C):

(0) arredondado ou levemente agudo

(1) espiniforme

Comentário:

O formato do último artículo do palpo labial é bastante variável e é independente da proporção entre o comprimento e largura no material analisado. Embora essas

variações tenham sido difíceis de qualificar ou quantificar, o estado 5:1 corresponde a um formato nitidamente distinto dos demais, porém sua abrangência é reduzida nesse conjunto de dados e apenas agrupa *Adhemarius donysa* e *A. dariensis*. Formato espiniforme ainda mais desenvolvido pode ser encontrado entre representantes da subfamília Sphinginae, como *Cocytius*, *Neococytius* e *Xanthopan* (Kitching, 2002). Este caráter foi utilizado por Kitching (2002) na filogenia de Acherontini. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

6. Palpos labiais, segundo e terceiro artículos, razão entre a maior largura (Figura 1.15):

(0) segundo artículo pelo menos três vezes mais largo do que o terceiro

(1) segundo artículo no máximo duas vezes mais largo do que o terceiro

Comentário:

Em boa parte dos esfingídeos, o último artículo dos palpos labiais é consideravelmente menor do que o segundo. Em Ambulycini o estado 6:1 é completamente homoplástico e também está presente em *Cypa decolor*, um dos terminais do grupo externo. Este caráter não é informativo. (l = 4; ci = 25; ri = 0)

7. Olhos, razão entre o comprimento do raio e a altura da cabeça (Figura 1.16):

(0) aproximadamente um terço da altura da cabeça

(1) muito menor do que um terço da altura da cabeça

Comentário:

A altura da cabeça é medida da base do olho até o vértice, considerando as escamas (Figura 1.16). A redução do olho (7:1) é um estado homoplástico e sua distribuição coincide com parte das espécies que apresentam o estado 6:1. Diferentemente, 7:1 agrupa também as espécies analisadas do gênero *Orecta*. (l = 4; ci = 25; ri = 40)

Figura 1.16. Cabeça em vista lateral. A. *Adhemarius palmeri* (7:0); B. *Orecta lycidas lycidas* (7:1). Barras brancas representam a medida da altura da cabeça, barras pretas, as medidas do raio do olho e barras mescladas a proporção entre as medidas.

8. Pilífero:

(0) presente

(1) ausente

Comentário:

Rothschild & Jordan (1903) destacam a ausência desta estrutura em *Cypa*. Aqui, esta é uma autapomorfia de *Cypa decolor*, usada como caráter contingente junto ao caráter número 10. (l = 1)

9. Pilífero, margem lateral externa, distância relativa à margem lateral interna do processo genal (Figura 1.17):

(0) separadas

(1) muito próximas ou aparentemente fundidas

Comentário:

Em Ambulycini menos *Barbourion lemaii*, a forma do processo genal e sua proximidade relativa ao pilífero são características com pouca variação. Na topologia adotada (Figura 1.5), um pequeno distanciamento entre o pilífero e o processo genal (9:0), ocorre nos terminais que correspondem ao gênero *Orecta* e a *Trogolegnum pseudambulyx* (Boisduval, 1875). Este estado está também presente em *Barbourion lemaii*. (l = 4; ci = 25; ri = 40)

10. Processo genal, formato (Figura 1.17):

(0) semiesférico

(1) subpiramidal

(2) plano

Comentário:

O processo genal é pouco sobressalente em *Parum colligata* e *Cypa decolor*, diferenciando-se da forma mais comum em Sphingidae, descrita por Rothschild & Jordan (1903) como aproximadamente piramidal. Em Ambulycini, apenas os exemplares de *Orecta l. lycidas* e *O. lycidas eos* analisados apresentam uma variação digna de ser codificada em um estado distinto. (l = 2; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.17. Cabeça em vista frontal. A. *Parum colligata*; B. *Daphnusa aйлanti*; C. *Orecta lycidas*; D. *Trogolegnum pseudambulyx*; E. *Protambulyx strigilis*. Setas pretas indicam o processo genal; setas brancas representam o espaçamento entre o processo genal e o pilífero.

11. Rudimento do palpo maxilar, escamas, organização (Figura 1.18):

(0) decumbentes

(1) eriçadas

Comentário:

Não foi observado na literatura nenhum comentário sobre as escamas que revestem o rudimento do palpo maxilar, porém na análise do material dois estados marcadamente distintos puderam ser codificados. A configuração deste caráter para *Parum colligata* e *Cypa decolor* não pôde ser acessada nos exemplares analisados. A ausência de escamas nessa estrutura para estes terminais foi tratada como incerta, posto que essas escamas parecem ser perdidas com facilidade. Caráter não informativo. (I = 1)

Figura 1.18. Escamas do rudimento do palpo maxilar. A. Escamas assentadas em *Daphnusa ailanti* (11:0); B. escamas eriçadas em *Compsulyx cochereaui* (11:1).

12. Antena, último artículo, formato (Figura 1.19):

(0) setiforme

(1) não setiforme

Comentário:

Rothschild & Jordan (1903) ilustraram as diferenças encontradas nesta estrutura e discutiram sua importância taxonômica. Na topologia adotada (Figura), o estado 12:1 é uma sinapomorfia que agrupa os mesmos gêneros reunidos pelo estado 4:1. (I = 1; ci = 100; ri = 100)

13. Antena, último artículo, comprimento relativo ao penúltimo artículo (Figura 1.19):

(0) até uma vez e meia mais longo

(1) mais do que duas vezes mais longo

Comentário:

Embora aparentemente redundante com o caráter 12 e até dependente deste, foi observada uma diferença relevante no grupo externo. *Parum colligata* e *Daphnusa aйлanti* que foram codificadas no estado 12:0, apesar de possuírem o último antenômero com formato cilíndrico e, assim, bastante diferente do penúltimo, aquele é apenas um pouco mais comprido que o anterior. Rothschild & Jordan (1903) discutem qual o estado ancestral para este caráter, embora sem o amparo da metodologia cladística. Para os autores, apesar da presença predominante de um último antenômero curto em ‘Heterocera’ sugerir o contrário, suas análises levando em consideração o desenvolvimento deste e de outros órgãos em Sphingidae levam à conclusão que o último artículo curto é o estado derivado de um ancestral com este artículo longo e fino. (l = 3; ci = 33; ri = 85)

Figura 1.19. Ápice da antena (adaptado de Rothschild & Jordan, 1903). A. *A. pryeri*; B. *P. strigilis*; C. *A. gannascus*. Os desenhos não estão em escala.

Tórax

14. Tégula, mancha de tonalidade escura:

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

A presença de uma mancha de coloração mais escura contrastando com a coloração predominante do corpo é uma característica de distribuição homogênea em Ambulycini. As únicas exceções são *Barbourion lemai* e *Compsulyx cochereaui*. (l = 3; ci = 33; ri = 33)

15. Tégula, mancha de tonalidade escura, extensão (Figura 1.20):

(0) apenas a borda anterior interna com a cor dominante

(1) com a borda anterior interna e posterior externa com a cor dominante

Comentário

A variação codificada pelo estado 15:1, apesar de ter uma distribuição homoplástica na topologia adotada, agrupa com segurança todos os exemplares do gênero *Ambulyx* analisados. (l = 3; ci = 66; ri = 83)

Figura 1.20. Tórax em vista dorsal. A. *Barbourion lemai* (14:0); B. *Ambulyx pryeri* (15:1); C. *Adhemarius gannascus* (15:0). Linha branca demarcando o limite aproximado das escamas da tégula; o contorno da linha não representa o formato da estrutura.

16. Tergito mesotorácico, região posterior, par de manchas claras (Figura 1.21):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Um par de manchas mais claras sobre a região posterior do mesotórax, segundo a topologia adotada, pode ter surgido cedo na filogenia de Ambulycini, embora três reversões independentes devam ser consideradas, pela topologia adotada. (l = 4; ci = 25; ri = 57)

Figura 1.21. Vista dorsal do tórax de duas espécies de *Adhemarius*. A. *A. gannascus* (setas indicam manchas claras na região posterior do tergito metatorácico, 16:1); B. *A. eurysthenes*.

Pernas

17. Perna anterior, tíbia, ápice, projeção espiniforme (Figura 1.22):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Segundo Rothschild & Jordan (1903), esta característica é comum entre os insetos e em Sphingidae ela pode ser encontrada em todas as subfamílias, exceto em “Choerocampinae”. O comprimento desta projeção variou bastante entre os terminais, não sendo possível incluir essa informação na análise. (l = 3; ci = 33; ri = 60)

Figura 1.22. Ápice da tíbia anterior. A. *Ambulyx schauffelbergeri*; B. projeção espiniforme em *Batocnema africanus*.

18. Perna anterior, tíbia, face anterior, espinhos (Figura 1.23):

(0) ausentes

(1) presentes

Comentário:

A presença de espinhos na tíbia também é uma característica recorrente em Sphingidae, podendo ser encontrada entre representantes da subfamília Sphinginae. Entre as espécies analisadas, apenas em cinco terminais os espinhos estão presentes, quatro deles pertencem à tribo Ambulycini e, embora não formem um grupo monofilético, estão proximamente relacionados na topologia adotada. Segundo Kitching (2002), cerdas tibiais bem desenvolvidas são genericamente referidas como espinhos e quando são realmente grandes e fortes, o termo a ser utilizado deve ser ‘*claw*’ (garra, em tradução livre). Embora não exista evidência experimental, Hogue (1963) sugere que tais garras sejam úteis na emergência do adulto em substrato seco, posto que são mais frequentemente encontrados em espécies de habitat áridos e semiáridos. Em contrapartida, ao menos dois dos exemplares (*Adhemarius tigrina* e *A. sexoculata*) com espinhos robustos nas tíbias possuem parte de sua distribuição no bioma Amazônico, conhecido pelos seus altos índices de umidade. Os quatro Ambulycini que compartilham o estado 18:1 são neotropicais. Este caráter foi utilizado por Kitching (2002). (l = 3; ci = 33; ri = 50)

Figura 1.23. Espinhos da face anterior de pró-tíbia. A. Tíbia de *Orecta lycidas* sem espinhos (18:0); B. espinhos na tíbia (setas) de *Adhemarius tigrina*.

19. Arólio, razão entre sua maior largura e a largura de sua base (Figura 1.24):

(0) mais do que duas vezes a largura da base

(1) menos do que duas vezes a largura da base

Comentário:

A largura do arólio é uma variável adaptada do caráter 17 de Kitching (2002). O estado 19:0 é compartilhado entre a maioria dos Ambulycini e *Daphnusa ailanti*. Porém seus baixos índices de consistência e de retenção mostram que este não é um caráter muito informativo. (l = 4; ci = 25; ri = 25)

Figura 1.24. Esquema de um basitarso mostrando a medição da largura do arólio. Barras indicam as medidas de comprimento utilizadas.

20. Perna mediana, fêmur, ápice, mancha esbranquiçada (Figura 1.25):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

A face externa das pernas medianas e posteriores da maioria dos Ambulycini apresentam uma mancha clara em destaque ao longo da articulação entre o fêmur e a tibia. Entretanto, ainda menos inclusiva é a presença da porção do fêmur desta mancha. Assim, o caráter codificado avalia a presença e a ausência desta mancha apenas sobre o fêmur. (l = 2; ci = 50; ri = 91)

Figura 1.25. Ápice do fêmur. A. Ápice manchado (20:1) em *A. palmeri*; B. ápice sem mancha (20:0) em *A. schauffelbergeri*.

21. Machos, perna mediana, maior esporão tibial, comprimento relativo à tibia:

- (0) menor do que um quarto do comprimento
- (1) maior do que a metade do comprimento
- (2) de um quarto a metade do comprimento da tibia

Comentário:

Trogolegnum pseudambulyx foi o único terminal que apresentou dimorfismo evidente entre o tamanho dos esporões tibiais. Por esta razão, a medida é especificada para os machos. Esporões robustos e pontiagudos também podem ser encontrados em outras espécies de Sphingidae. Em Ambulycini, há redução dos esporões em *Orecta* e *Akbesia*. O tamanho intermediário é encontrado em três instâncias entre os Ambulycini, mas é mais homogeneamente difundido em *Protambulyx*. (l = 6; ci = 33; ri = 73)

22. Pernas mediana e posterior, tibia, região dos esporões, tufo de escamas longas (Figura 1.28):

- (0) presente
- (1) ausente

Comentário:

A presença de tufo de escamas na base dos esporões tibiais tem surgimentos independentes em *Parum colligata*, *Barbourion lemai* e *Trogolegnum pseudambulyx* na topologia adotada (Figura 1.28). (l = 3; ci = 33; ri = 0)

23. Perna posterior, último tarsômero, comprimento relativo ao penúltimo tarsômero (Figura 1.26):

(0) igual a menos de uma vez e meia o comprimento do penúltimo tarsômero

(1) mais do que uma vez e meia o comprimento do penúltimo tarsômero

(2) último distintamente mais curto

Comentário:

Diferenças no comprimento relativo entre o último e o penúltimo tarsômero das pernas posteriores foram significativas para as topologias encontradas e possui um alto índice de retenção na topologia adotada. A distribuição dos estados deste caráter precisa ser melhor estudada dentro do gênero *Ambulyx*, táxon pouco amostrado no presente trabalho. (l = 5; ci = 20; ri = 66)

Figura 1.26. Região distal dos tarsos das pernas posteriores. A. *A. pryeri*; B. *P. strigilis*; C. *T. pseudambulyx*. Barras pretas indicam as proporções entre o penúltimo e o último tarsômeros.

24. Perna posterior, ápice do último tarsômero, face posterior, grupo de cerdas, posição relativa ao espinho mais apical (Figura 1.27):

(0) lateroapical em relação ao espinho mais apical

(1) contornando lateralmente o espinho mais apical

Comentário:

Um grupo de cerdas sensoriais pode ser encontrado próximo as garras terminais nos exemplares analisados. Uma pequena variação observada foi codificada para ser filogeneticamente testada. Por ser um caráter original, de difícil visualização e codificação e distribuição dos estados, recomenda-se um estudo futuro mais detalhado do grupo de cerdas em questão. (l = 5; ci = 20; ri = 66)

Figura 1.27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do último tarsômero das pernas posteriores de *A. daphne* (A) e *P. strigilis* (B), mostrando os estados 24:1 e 24:0 respectivamente. Setas brancas apontam as cerdas e setas pretas o espinho mais apical.

25. Perna posterior, tíbia, par de esporões, proporção (Figura 1.28):

(0) o menor medindo $\frac{2}{3}$ ou mais do comprimento do maior

(1) o menor medindo cerca da metade ou menos do comprimento do maior

Comentário:

Uma pequena variação na proporção entre os esporões tibiais pares pode ser frequentemente verificada entre as linhagens de Ambulycini. Porém, esporões efetivamente assimétricos só são encontrados na linhagem do gênero *Protambulyx* e em *Compsulyx cochereaui*. (l = 2; ci = 50; ri = 87)

Figura 1.28. Esporões tibiais. A. Tíbia posterior de *Adhemarius palmeri*; B. tíbia média de *Protambulyx carteri*, barras sugerem assimetria entre os esporões; C. tufo de longas escamas encobrindo a base dos esporões da tíbia posterior de *Trogolegnum pseudambulyx*; D. tíbia média de *Barbourion lemai*.

26. Perna posterior, primeiro tarsômero, comprimento relativo à tíbia:

(0) primeiro tarsômero um pouco menor ou com comprimento subigual em relação à tíbia

(1) primeiro tarsômero maior

Comentário:

A divisão do primeiro estado em duas categorias gerou um ruído na análise. Além disso, por se tratar de um caráter contínuo, entendeu-se ser mais apropriado a união destas categorias, tornando o estado 26:0 mais inclusivo e informativo. Apesar de ter distribuição homoplástica na topologia adotada, o estado 26:1 é compartilhado entre todas as espécies do gênero *Adhemarius*. (1 = 4; ci = 25; ri = 72)

Abdômen

Figura 1.29. Esquema do abdômen de *A. eurysthenes*. Seta indicando o pincel odorífero. Abreviação: T, tergito.

27. Machos, primeiro tergito visível, escamas, coloração (Figura 1.30):

(0) com a mesma coloração do tergito metatorácico

(1) com a mesma coloração do segundo tergito visível

Comentário:

As escamas que cobrem o primeiro tergito abdominal visível (tergito de A2) nos exemplares secos partem do primeiro tergito abdominal e se sobrepõem às escamas do segundo tergito abdominal. O estado 27:0 é compartilhado entre os gêneros *Akbesia*, *Compsulyx*, *Batocnema*, *Orecta*, *Trogolegnum* e *Adhemarius*, embora também tenha sido observado em *Protambulyx eurycles* e *P. sulphurea*. (l = 2; ci = 50; ri = 93)

Figura 1.30. Região entre o tórax e o abdômen em vista dorsal. A. Primeiro tergito visível apresentando a mesma coloração que o metatórax (27:0) em *A. tigrina*; B. primeiro tergito visível com a mesma coloração do restante do abdômen (27:1) em *A. pryeri*.

28. Macho, segundo esternito, pincel odorífero (Figura 1.29):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Rothschild & Jordan (1903) relacionam a presença do órgão de odor, formado por um orifício na pleura acima do ‘esternito basal’, a todas as espécies de Sphingidae. Segundo os autores, ela está sempre acompanhada pela presença de longas escamas dispersoras de odor (pincel odorífero) que podem estar retraídas sob uma dobra, ou cavidade. Apesar de não ter sido avaliada a presença de órgão de odor, a presença do pincel odorífero (Figura 1.29) não foi observada nos exemplares de *Parum colligata* e *Cypa decolor* estudados. Assim, o estado 28:1 reúne *Daphnusa* e a tribo Ambulycini na topologia adotada (Figura 1.5). (l = 1; ci = 100; ri = 100)

29. Quinto segmento, tergito, região mediana, mancha escura:

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Manchas longitudinais escuras na região mediana dos tergitos abdominais são frequentes em Ambulycini e bem demarcadas na maioria das espécies. Já sua extensão, tanto ao longo dos tergitos quanto do abdômen, é bastante variável. Usando a presença e a extensão da mancha no quinto tergito, foi testada a hipótese de homologia primária entre as manchas de todas as espécies. Segundo a topologia adotada a presença da mancha no quinto tergito é uma simplesiomorfia de Ambulycini que foi perdida em algumas espécies. (l = 6; ci = 16; ri = 58)

30. Quinto segmento, tergito, região mediana, mancha escura, extensão:

(0) faixa completa atravessando todo o tergito

(1) apenas a porção anterior presente

Comentário:

Para maiores informações, ver comentário do caráter 29. Para a topologia adotada, o estado 30:0 é plesiomórfico para este caráter. (l = 3; ci = 33; ri = 75)

31. Sexto segmento, tergito, manchas laterais:

(0) ausentes

(1) presentes

Comentário:

A presença de manchas laterais no sexto tergito é uma particularidade de algumas espécies do gênero *Ambulyx*. No conjunto de táxons analisados ela está presente apenas em *A. japonica* e *A. schauffelbergeri*. (l = 1; ci = 100, ri = 100)

32. Oitavo segmento, esternito, processo caudal (Figura 1.31):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Um processo caudal está presente em várias espécies de Ambulycini com tamanhos e formatos variados. Com exceção de *A. tigrina*, ausência desta característica abrange todas as espécies de *Adhemarius*, além de *Trogolegnum pseudambulyx*, *Akbesia davidi* e *Compsulix cochereaui*. *Ambulyx schauffelbergeri* foi codificada com o estado 32:0, porém a presença do processo com comprimentos variados em todos os demais representantes do gênero, sugere que ele esteja presente, porém extremamente reduzido. (l = 5; ci = 20; ri = 73)

Figura 1.31. Extremidade posterior do abdômen de *P. goeldii* em vista ventral. Linhas pretas ilustram como foi tirada a proporção entre o comprimento do processo o comprimento do oitavo esternito nos exemplares montados.

33. Oitavo segmento, esternito, processo caudal, comprimento relativo ao comprimento do esternito (Figura 1.31):

(0) de $\frac{1}{4}$ a menos da metade do comprimento do esternito

(1) de metade a uma vez o comprimento do esternito

(2) menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento do esternito

(3) maior do que o comprimento total do esternito

Comentário:

O comprimento do esternito foi medido no abdômen dos exemplares secos e, portanto, do limite posterior do sétimo esternito, que efetivamente cobre a margem anterior do esternito seguinte, até a margem do oitavo esternito sem contar o processo. A divisão dos estados de um caráter em classes de categorias é um recurso utilizado para transformar caracteres quantitativos contínuos em quantitativos discretos (Kitching *et al.*, 1998). Este caráter foi congruente com a topologia adotada em um único nó, ao agrupar *Batocnema africanus* e *B. cocquerellii*. (l = 8; ci = 37; ri = 16)

34. Machos, oitavo segmento, tergito, mancha escura (Figura 1.32):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Na topologia adotada (Figura 1.5), esta é uma sinapomorfia que reúne todos os Ambulycini menos *Barbourion lemaii*. Na maioria dos exemplares neotropicais, o oitavo tergito completamente manchado, com coloração mais escura que a coloração do restante do abdômen, é uma característica marcante do macho, permitindo a rápida identificação do sexo dos indivíduos ainda em campo, exceção feita às espécies do morfotipo *dariensis* (ver seção 4.2) e *Trogolegnum pseudambulyx*, nas quais a mancha é bastante reduzida. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.32. Porção distal do abdômen. A. *A. donysa* (35:0); B. *A. gannascus* (35:1).

35. Machos, oitavo segmento, tergito, mancha escura, tamanho:

(0) pequena mancha mediana na porção anterior

(1) cobrindo praticamente o tergito inteiro

Comentário:

Ver comentário do Caráter 34 para mais informações. Manchas reduzidas definem dois grupos na topologia adotada: um formado pelas cinco espécies de *Ambulyx* e o outro por *T. pseudambulyx*, *A. donysa* e *A. dariensis*. (l = 2; ci = 50; ri = 85)

36. Machos, oitavo segmento, tergito, cortina estridulatória (Figura 1.33):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Kitching (2002) chamou de cortina estridulatória a fileira de escamas inseridas sob a margem do oitavo tergito nos machos de Acherontini. (l = 2; ci = 50; ri = 66)

Figura 1.33. Órgão estridulatório. A. Vista ventral da extremidade distal do abdômen de *Batocnema africanus*, setas indicando a cortina estridulatória de escamas; B. escamas de fricção (seta) na valva de *Adhemarius gannascus*; C. mancha estridulatória de escamas (seta) persistente na valva de *Batocnema cocquerelii* após dissecação da genitália.

37. Machos, oitavo segmento, tergito, cortina estridulatória, escamas, formato (Figura 1.34):

(0) formato de foice

(1) com bordas convexas

Comentário:

O formato das escamas da cortina estridulatória também foi avaliado como um marcador morfológico no trabalho de Kitching (2002). (l = 2, ci = 50; ri = 85)

Figura 1.34. Esquema das escamas da cortina estridulatória. A. Escamas em forma de foice sobrepostas e com ápices livres (37:0); B. escamas com bordas convexas sobrepostas (37:1); C. duas escamas acopladas no ápice (seta) (38:0).

38. Machos, oitavo segmento, tergito, cortina estridulatória, escamas, ápice, acoplamento (Figura 1.34C):

(0) acoplados

(1) livres

(2) acoplados em pequenos grupos

Comentário:

A margem livre da cortina estridulatória é bastante reforçada pelo acoplamento das escamas no gênero *Protambulyx*. Os ápices das escamas nesse grupo são sobrepostos em uma pequena dobra, aparentemente tornando a margem da região de atrito mais

rígida. Quando capturados, indivíduos de *P. strigilis* estridulam mais intensamente do que espécies de *Adhemarius* (observação pessoal). O uso do órgão estridulatório no cortejo das fêmeas pelos machos é uma das principais hipóteses sobre a função deste aparato, embora este comportamento não tenha ainda sido confirmado experimentalmente. Kitching (2002) considera que a variação encontrada nas escamas da cortina estridulatória e das valvas pode ser resultado de assinaturas sônicas espécie-específicas, suportando a hipótese de uma função sexual. A estridulação dos indivíduos ao serem manipulados como estratégia de defesa entretanto, não é descartada. (l = 2; ci = 100; ri = 100)

Asas

Figura 1.35. Esquema das asas de *Protambulyx strigilis*. A. asa anterior e B. asa posterior. Retináculo não foi representado. Abreviações: A, anal; CuA, cubital anterior; cu, cubital; dci, discocelular inferior; dcm, discocelular mediana; M e m, média; R, radial.

Nota explicativa: Nijhout (1991) traça dois sistemas de simetria baseado nos padrões de coloração, caracterizados por imagens espaciais de si mesmos dentro de seus limites proximal e distal: O Sistema de Simetria Basal (SSB) e o Sistema de Simetria Central (SSC). Segundo o autor, estes são os elementos do plano básico da maioria dos Lepidoptera que podem ser usados em hipóteses de homologia.

Outra base importante é a independência das células da asa, separadas umas das outras pelas veias. Este isolamento é responsável pela formação de manchas oclares nos sistemas de simetria estudados por Nijhout (1991), e é determinado geneticamente. Dessa forma, os limites dos elementos de coloração de uma asa podem ser considerados em estudos filogenéticos.

Figura 1.36. Face dorsal da asa anterior de um Ambulycini genérico mostrando os principais elementos de coloração utilizados neste trabalho. Outros elementos existentes que não foram utilizados não estão representados.

39. Asa anterior, R4, alcance em relação a R5 (Figuras 1.35 e 1.37):

(0) ultrapassando R5 em distância menor àquela que R5 ultrapassa M1

(1) ultrapassando R5 em distância aproximadamente igual àquela que R5 ultrapassa M1

Comentário:

Foi utilizado o alcance como medida, já que este apresenta uma variação mais fácil de mensurar do que propriamente a apresentada pelos comprimentos relativos. Para padronizar o alcance das veias, buscou-se situar a asa sobre um plano cartesiano, cujo eixo horizontal tangencia tanto a margem interna quanto o ângulo anal, conforme Figura 1.37. ($l = 1$; $ci = 100$; $ri = 100$)

Figura 1.37. Esquema da medição do alcance relativo entre as veias R4 e R5. Asa anterior de *Protambulyx strigilis*.

40. Asa anterior, célula formada por R4 e R5, margem externa, contorno (Figura 1.38):

(0) convexo

(1) reto ou levemente côncavo

(2) muito côncavo

Comentário:

Uma das características que primeiro chamam a atenção em Ambulycini, presente em quase todos os representantes neotropicais é o falcamento no ápice das asas anteriores. *Orecta* distingue-se dos demais gêneros por apresentar a margem externa convexa nessa região. *Compsulyx* apresenta o ápice da asa arredondado, mas especificamente entre as veias R4 e R5 o contorno é mais próximo daquele encontrado em *Amplipterus* do que o de *Orecta*. (l = 2; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.38. Asa anterior. Contorno da margem externa da célula formada por R4 e R5 em *Ambulyx substrigilis* (A), *Orecta lycidas lycidas* (B – face ventral); *Adhemarius donysa* (C) e *Compsulix cochereaui* (D – face ventral).

41. Asa anterior, R5, menor distância entre extremidade distal e a veia M1 relativa à menor distância entre o nó de R5 e a veia M1 (Figura 1.39):

(0) aproximadamente a mesma (veias paralelas)

(1) perceptivelmente menor (veias convergentes)

Comentário:

A convergência de R5 e M1 é um estado que se diferencia muito pouco do estado 41:0, podendo gerar dúvidas em certos exemplares. Este caráter separa o gênero *Protambulyx* em duas linhagens, uma pouco diversa, mas com ampla distribuição geográfica, e outra com menor distribuição, mas com a maior parte das espécies. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.39. Ápice da asa anterior de *Protambulyx euryalus*. Barras pretas representam as medidas utilizadas para o caráter 41.

42. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal (Figura 1.36):

(0) distinto

(1) indistinto

Comentário:

Algumas espécies parecem não apresentar o SSB, porém, preferiu-se utilizar o termo indistinto por se tratar de um elemento altamente conservado (ver Nijhout, 1991), cuja presença é frequentemente mascarada pela coloração circundante. (l = 3; ci = 33; ri = 33)

43. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal, extensão (Figura 1.36):

(0) completa

(1) incompleta

Comentário:

O sistema de simetria basal é uma das características de maior variação na tribo Ambulycini. Na topologia adotada (Figura 1.5), este caráter apresentou um baixo sinal filogenético. (l = 7; ci = 14; ri = 0)

44. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal, porção externa (Figura 1.36):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

O SSB é comumente interrompido ao meio. Em algumas espécies do gênero *Protambulyx* a porção externa é menos marcada do que a porção interna. Aparentemente, isso também pode variar de acordo com o nível de preservação do exemplar. Em Ambulycini, a perda da porção externa do SSB é uma homoplasia presente em *Ambulyx pryleri*, *A. substrigilis* e *A. wildei* e basalmente em toda a linhagem dos ademariformes, embora uma banda completa tenha reaparecido em *T. pseudambulyx* e alguns *Adhamrius*. Em *P. strigilis*, foi considerada presente, apesar de estar bastante reduzida. (l = 3; ci = 33; ri = 80)

45. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal, porção externa, limite inferior (Figura 1.36):

(0) atingindo a margem interna da célula discal

(1) atingindo no máximo a margem costal da célula discal

(2) passando a margem costal da célula discal, mas não atingindo a margem interna

Comentário:

A diferença entre os estados 45:0 e 45:2 é um caráter diagnóstico confiável que distingue *P. eurycles* de *P. euryalus* e *P. ockendeni* sem sobreposição das variações. (l = 4; ci = 50; ri = 50)

46. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal, porção interna, limite inferior (Figura 1.36):

(0) partindo da margem interna da asa

(1) desconectada da margem interna da asa

Comentário:

Em Ambulycini, na maioria das vezes em que a porção interna está desconectada da margem interna da asa, o formato desse elemento é circular. No entanto, em algumas espécies do gênero *Ambulyx* não estudadas aqui, o formato pode ser mais alongado. (l = 2; ci = 50; ri = 83)

47. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria basal, porção interna, limite superior (Figura 1.36):

(0) passando a cicatriz da veia CuP, mas não atingindo a célula discal

(1) atingindo no máximo a cicatriz da veia CuP

Comentário:

O limite superior da porção interna do SSB frequentemente não ultrapassa a cicatriz da veia CuP, indicando a importância dessa veia na determinação dos elementos de coloração da asa. O estado 47:0 suporta a monofilia dos ademariformes, embora para três espécies nas quais o SSB se apresenta como uma banda completa, esse estado não tenha sido verificável. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

48. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria central, banda distal (Figura 1.36):

(0) discreta

(1) marcada

Comentário:

O SSC é aquele que delimita uma região com padrões simétricos iniciada por uma banda logo após o SSB e que se estende até um pouco depois da célula discal. Na maioria dos Ambulycini, quando visível, ela é estreita, curva e ondulada. (l = 2; ci = 50; ri = 50)

49. Asa anterior, face dorsal, sistema de simetria central, banda distal, formato (Figura 1.36):

(0) ondulado

(1) retilíneo

Comentário:

Uma banda em formato retilíneo teve três surgimentos independentes na filogenia de Ambulycini, segundo a topologia adotada. Sua presença reúne *T. pseudambulyx*, *A. dariensis* e *A. donysa* dentro dos ademariformes. (l = 3; ci = 33; ri = 50)

50. Asa anterior, face dorsal, mancha subapical (Figura 1.36):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Uma mancha levemente escurecida na região subapical da asa anterior pode ser observada em diversas espécies de Sphingidae, fora de Ambulycini. Mesmo com pouco

destaque, elas foram aqui consideradas homólogas àquelas manchas bem demarcadas, características dos ademariformes. (l = 2; ci = 50; ri = 50)

51. Asa anterior, face dorsal, mancha subapical, linha de contorno (Figura 1.36):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

As manchas subapicais dos ademariformes estudados são contornadas por uma fina camada de escamas claras que as realçam. Na topologia adotada, ela foi perdida no clado (*T. pseudambulyx*, (*A. dariensis*, *A. donysa*)). (l = 2; ci = 50; ri = 88)

52. Asa anterior, face dorsal, base, pequena mancha pontual (Figura 1.36):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Nijhout (1991) não apresenta uma definição clara sobre essa pequena mancha basal encontrada na maioria das espécies de Ambulycini. Assim, a terminologia utilizada para este caráter é apenas uma descrição da sua forma e localização e não segue a classificação da literatura. Não obstante, a fácil distinção desta mancha nas espécies analisadas e sua homogênea distribuição nas séries de exemplares, permite que seja tratada como estrutura homóloga para análises filogenéticas. (l = 4; ci = 25; ri = 75)

53. Asa anterior, face dorsal, mancha discal (Figura 1.36):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

A mancha discal sobre a veia *dci* está amplamente distribuída entre os Bombycoidea e, assim, ela é uma simplesiomorfia para Sphingidae. (l = 6; ci = 16; ri = 37)

54. Asa anterior, face dorsal, mancha discal, formato (Figura 1.36):

(0) vestigial, indefinida

(1) definida

Comentário:

Foram consideradas vestigiais as manchas extremamente reduzidas, geralmente representadas por um pequeno ponto branco sobre o encontro entre a veia *dci* e a veia M3. O estado 54:0 reúne os ademariformes com *C. cochereaui*, *Batocnema* spp. e *A. davidi* na topologia adotada. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

55. Asa anterior, face dorsal, banda submarginal (Figura 1.36):

(0) distinta

(1) indistinta

Comentário:

A banda submarginal apontada por Nijhout (1991) é uma estreita banda que contorna uma região manchada sobre a margem das asas anteriores presente em todos os Ambulycini e em diversos Sphingidae. (l = 4; ci = 25; ri = 80)

56. Asa anterior, face ventral, região basal, escamas filiformes rosadas (Figura 1.40):

(0) ausentes

(1) presentes

Comentário:

Em Ambulycini, esta é uma característica que suporta a monofilia do grupo que reúne *T. pseudambulyx* e a maior parte dos *Adhemarius*, menos *A. sexoculata* e *A. tigrina*. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

57. Asa anterior, face ventral, região basal, aglomerados de escamas filiformes enegrecidas entremeadas com escamas rosadas (Figura 1.40):

(0) ausentes

(1) presentes

Comentário:

O estado 57:0, apesar de homoplástico, suporta o agrupamento de espécies em dois ramos distintos. (l = 2; ci = 50; ri = 66)

Figura 1.40. Asa anterior em vista ventral. A. *Adhemarius gannascus*; B. *A. palmeri*.

58. Asa posterior, célula CuA_2-2A , margem externa (Figura 1.41):

(0) reta ou levemente côncava

(1) acentuadamente côncava

Comentário:

Asa posterior com margem dentilhada na região anal provavelmente compõe o palno basal dos Ambulycini, pela topologia adotada e pela maioria das topologias obtidas. (l = 4; ci = 25; ri = 78)

Figura 1.41. Asa posterior em vista dorsal. A. *Protambulyx goeldii* (58:0); B. *Adhemarius tigrina* (58:1).

59. Asa posterior, face dorsal, coloração de fundo, destaque:

(0) inconspícua

(1) conspícua

Comentário:

Uma asa posterior conspícua, que se destaca em relação à coloração da ansa anterior, esta geralmente críptica, pode ser observada em várias espécies de Lepidoptera e também de Sphingidae. Em Ambulycini, ela está presente a partir do nó interno 2, em todos os seus representantes. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

60. Asa posterior, face dorsal, coloração de fundo:

(0) castanha a castanhoacinzentada

(1) laranja claro a amarela

(2) rosa claro a rosa escuro

(3) laranja escuro

Comentário:

Asa posterior com coloração predominantemente amarelada compõe o plano basal de Ambulycini *sensu stricto*. Duas mudanças mais acentuadas se deram durante a história evolutiva dessa linhagem, conforma a topologia adotada: o escurecimento de tonalidade do amarelado para um laranja escuro (60:3) na linhagem do gênero *Orecta* e a transformação para rosa (60:2) em *T. pseudambulyx* e *Adhemarius* (menos *A. tigrina* e *A. sexoculata*). (l = 4; ci = 75; ri = 92)

61. Asa posterior, face dorsal, banda marginal (Figura 1.41):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

A banda marginal da asa posterior parece ter origens independentes nos táxons estudados, como indica o reduzido valor do índice de consistência. Porém, a distinção deste elemento define grupos dentro de Ambulycini. (l = 5; ci = 20; ri = 75)

62. Asa posterior, *dcm* e *dci*, proporção (Figuras 1.35 e 1.42):

(0) *dcm* maior

(1) aproximadamente iguais

(2) *dci* maior

Comentário:

Rothschil & Jordan (1903) e Minet (1994) comentaram variações neste caráter. Segundo Jordan (1923), o estado 62:1 é plesiomórfico para as seis seções taxonômicas consideradas no artigo, entre as quais está Sphingidae. (l = 9; ci = 22; ri = 53)

Figura 1.42. Asa posterior em vista ventral. A. *Cypa decolor*; B. *Daphnusa aйлanti*; C. *Parum colligata*. Barras pretas ilustram as medidas utilizadas para o caráter 62. Arco com cabeças de seta ilustram o caráter 63.

63. Asa posterior, ângulo interno entre *dci* e *m-cu* (Figura 1.42):

(0) aproximadamente reto

(1) visivelmente agudo

(2) obtuso

Comentário:

Segundo Rothschild & Jordan (1903), em Sphingidae, a veia *dci* (D^3) raramente é transversa, porém, sempre apresenta essa orientação, o ângulo formado com a veia *m-cu* é reto ou obtuso. Caráter não informativo. (l = 2)

Genitália

64. Macho, nono tergito, apódema (Figura 1.43):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

O apódema é uma projeção interna do exoesqueleto de insetos onde ocorre a inserção de musculatura. Com importante função adaptativa, é esperado que diferenças como presença e ausência dessa estrutura tenham grande sinal filogenético. Uma elevação mediana na parede interna do nono tergito pode ser observada em quase todos os táxons de Ambulycini *sensu stricto*, estando ausente apenas em *A. substrigilis* e *A. wildei*. (l = 2; ci = 50; ri = 66)

Figura 1.43. Genitália masculina em vista dorsal. Região do tegume (nono e décimo tergito). A. *Amplypterus panopus* (seta indicando apódema); B. *Ambulyx wildei*.

65. Macho, valva, harpe (Figura 1.44):

(0) presente

(1) ausente

Comentário:

A harpe é uma estrutura que pode assumir uma enorme diversidade de formas em Lepidoptera, o que contribuiu para várias controversas sobre sua homologia entre os grupos. Kitching (2002, 2003) atribui esse termo à projeção em forma de espinho presente nas valvas de Acherontini, que são bastante semelhantes aquelas encontradas em Ambulycini. (l = 2; ci = 50; ri = 50)

Figura 1.44. Genitália masculina. Face interna da valva. A. *Daphnusa aйлanti*; B. *Cypa decolor*; C. *Barbourion lemai*; D. *Akbesia davidi*; E. *Ambulyx schauffelbergeri*; F. *A. pryeri*. Setas brancas, harpe, exceto em *Cypa*; setas pretas, processo do sáculo.

66. Macho, valva, harpe, formato (Figura 1.44):

(0) triangular ou subtriangular

(1) estreito, espiniforme

(2) reduzido

Comentário:

Uma harpe pequena e triangular é a mais difundida entre os gêneros de Ambulycini, podendo ser observada em sete dos 10 gêneros da classificação atual. (l = 5; ci = 40; ri = 72)

67. Macho, valva, sáculo, processo do sáculo (Figura 1.44):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Segundo a topologia adotada (Figura 1.5), esta estrutura foi perdida precocemente na história evolutiva de Ambulycini e, com exceção de *Barbourion lemai* e as espécies do gênero *Ambulyx*, está ausente em todas as demais espécies. A genitália de *C. decolor* também está destituída deste processo. (l = 2; ci = 50; ri = 85)

68. Macho, valva, sáculo, processo do sáculo, formato (Figura 1.44):

(0) projetado caudalmente com ápice arredondado não dilatado

(1) dilatado e discoide, pouco projetado

Comentário:

Caráter não informativo. (l = 1)

69. Macho, valva, face externa, escamas estridulatórias (Figura 1.33):

(0) ausentes

(1) presentes

Comentário:

Akbesia davidi tem tanto as escamas da cortina quanto as escamas estridulatórias aparentemente não funcionais: escamas estridulatórias grandes e moles que saem com facilidade e escamas da cortina muito largas e finas. Assim também é em *Orecta*, mas as escamas das valvas são tão homogêneas em formato que foram consideradas ausente, isto é, uma reversão. Entretanto a cortina, neste gênero, é mais bem desenvolvida do que em *Akbesia davidi*. (l = 3; ci = 33; ri = 60)

70. Macho, valva, face interna, estrias longitudinais:

(0) marcadas

(1) não marcadas ou ausentes

Comentário:

Estrias longitudinais são evidentes apenas nas valvas das espécies de *Ambulyx* analisadas e são identificadas por sulcos rasos que, na maioria das vezes, atravessam essas estruturas de uma extremidade a outra. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

71. Macho, saco, ápice (Figura 1.45):

(0) não projetado

(1) projetado

Comentário:

Segundo a topologia adotada, sacos projetados provavelmente estavam presentes no ancestral de Ambulycini, e foram perdidos independentemente ao menos duas vezes: uma no gênero *Ambulyx* e outra na linhagem que reúne todos os demais Ambulycini *sensu stricto*. (l = 3; ci = 33; ri = 75)

Figura 1.45. Desenho esquemático do saco em vista ventral. A. 72:1; B. 72:0; C. 71:1

72. Macho, saco, ápice não projetado, formato em vista ventral (Figura 1.45):

(0) com contorno arredondado a levemente agudo

(1) truncado, reto

Comentário:

O formato do saco é bastante variado em Ambulycni. A separação dessas variações em dois estados pode ser considerada imprecisa. (l = 4; ci = 50; ri = 33)

73. Macho, gnato (Figura 1.46):

(0) presente

(1) ausente

Comentário:

A ausência desta estrutura só pôde ser confirmada em *Cypa decolor*, mas é sugerida pelo material de *Daphnusa ailanti* estudado, cuja genitália estava danificada. Embora bastante reduzido em alguns terminais de *Ambulyx*, um gnato projetado é a condição evidenciada para todos os Ambulycini. Este caráter não é informativo. (l = 1)

Figura 1.46. Genitália masculina. Gnato. A. *Daphnusa aйлanti*, em destaque a região onde deveria estar gnato; B. *Barbourion lemai*, seta indica gnato reduzido; C e D. *Ambulyx wildei*, gnato em vista posterior (C) e em vista ventral (D); E. *Protambulyx strigilis*; F. *Batocnema cocquerelii*; G. *Orecta l. lycidas*; H. *O. acuminata*; I. *Adhemarius tigrina*; J. *A. palmeri*.

74. Macho, gnato, formato (Figura 1.46):

- (0) achatado e reto
- (1) achatado e curvo com ápice projetando-se para cima
- (2) côncavo, em forma de concha
- (3) reto, com ápice levemente dilatado
- (4) estreito, em forma de bastão

Comentário:

Devido à variedade de formas dessa estrutura é difícil estipular o estado ancestral desse caráter. Pelo formato observado em *B. lemai* (74:4), supõe-se que o ancestral de Ambulycini tivesse uma gnato bastante reduzido. (l = 9; ci = 44; ri = 66)

75. Macho, gnato, espinhos (Figura 1.46):

- (0) ausentes
- (1) presentes

Comentário:

Considerando o conjunto de dados analisado e a topologia adotada, um gnato espinhoso deve ter surgido na linhagem que reúne todas as espécies neotropicais e suas aliadas. (l = 2; ci = 50; ri = 83)

76. Macho, gnato, espinhos, tamanho e distribuição:

- (0) robustos distribuídos pela maior parte da estrutura
- (1) muito pequenos e escassos
- (2) pequenos e mais concentrados sobre a margem

Comentário:

Apesar de ‘tamanho’ e ‘distribuição’ serem variáveis distintas, seus estados foram combinados neste caráter por conta da dependência mútua observada entre as variações. Segundo Kawahara *et al.* (2009), *Akbesia davidi*, *Compsulix cochereaui* e *Batocnema* spp. podem ser mais proximamente relacionadas às espécies neotropicais devido também à presença de um gnato espinhoso na genitália masculina. (l = 5; ci = 40; ri = 62)

77. Macho, juxta, projeção dorsal (Figura 1.47):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

De todas as variações no formato da juxta, a presença e ausência de uma projeção dorsal que envolve lateralmente o edeago, é o que aparentemente apresentaria o maior sinal filogenético. (l = 5; ci = 20; ri = 71)

Figura 1.47. Desenho esquemático da juxta. A. Juxta de *A. wildei* (77:0); B. juxta de *O. lycidas*, seta indicando projeção dorsal (77:1). Círculo tracejado indica a região por onde passa o edeago.

78. Macho, edeago, rostelo, composição:

(0) simples, como uma única estrutura

(1) composto, com placa acessória

Comentário:

Três das cinco espécies de *Ambulyx* analisadas apresentam uma placa acessória conferindo resistência à região ventral da vesica. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.48. Genitália masculina. Edeago. A. *D. ailanti* (80:3); B. *C. decolor* (80:1), cabeça de seta indicando espinho torcido formado pelo rostelo; C. *B. lemai*, seta branca apontando a carina penis; D. *A. wildei*, rostelo (seta) com placa acessória em vista ventral; E. *P. sulphurea* (80:2); F. *C. cochereaui*; G. *A. eurysthenes*, barras brancas ilustrando a medição dos estados do caráter 79. A-C e E-G edeago em vista lateral. Setas pretas apontam o rostelo.

79. Macho, edeago, rostelo, comprimento em relação à porção externa do edeago (Figura 1.48):

(0) com aproximadamente o mesmo comprimento ou maior

(1) com cerca de metade ou menos do comprimento

Comentário:

O estado 79:1, apesar da distribuição homoplástica na topologia adotada, define a linhagem de *Adhemarius sensu stricto*. (l = 5; ci = 20; ri = 60)

80. Macho, edeago, rostelo, ornamentação (Figura 1.48):

(0) simples, sem ornamentação perceptível

(1) com pequeno processo em forma de espinho na sua região proximal

(2) com carena sobressalente

(3) dilatação em forma de bolha

Comentário:

Rostelos com ornamentação complexa são encontrados apenas em representantes do gênero *Ambulyx*. O formato de estruturas esclerotizadas das genitálias evolui rapidamente e há grandes chances de ornamentações, como as desse caráter, serem derivadas de surgimentos independentes, conforme discutido em Klots (1970). (l = 6; ci = 50; ri = 78)

81. Macho, edeago, vesica, divertículos:

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

A ausência de divertículos está apenas relacionada a *Cypa decolor*. (l = 1)

82. Macho, edeago, vesica, número de divertículos (Figura 1.49):

(0) um

(1) três

(2) dois

Comentário:

Kitching (2002) analisa a variação do número de divertículos. Nos comentários relacionados a este caráter, o autor menciona que a vesica de Ambulycini é composta por três divertículos. No entanto, dois divertículos foi o estado encontrado para duas espécies (*Akbesia davidi* e *Compsulyx cochereaui*) da tribo no presente estudo. (l = 2; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.49. Genitália masculina. Vesica. A. *Cypa decolor*, vesica como um tubo simples, sem divertículos; B. *Compsulyx cochereaui*, vesica com dois divertículos; C. *Protambulyx strigilis*, vesica com três divertículos (dois laterais e um central).

83. Macho, edeago, vesica, divertículos, comprimento relativo:

- (0) aproximadamente do mesmo tamanho
- (1) um menor, com cerca de metade do comprimento dos outros dois subiguais
- (2) um mais desenvolvido do que os outros dois subiguais

Comentário:

Foram considerados portadores do estado 83:0 também os indivíduos com dois divertículos subiguais e o terceiro apenas um pouco menor. (l = 6; ci = 33; ri = 66)

84. Macho, edeago, vesica, maior divertículo, face externa, placa de esclerotização:

- (0) ausente
- (1) presente

Comentário:

Nas cinco espécies de *Ambulyx* analisadas o maior divertículo apresenta uma região esclerotizada, por vezes desenvolvida em uma carena. (l = 1; ci = 100; ri = 100)

85. Macho, edeago, ceco, formato (Figura 1.50):

- (0) não projetado
- (1) muito projetado
- (2) pouco projetado
- (3) expandido lateralmente e terminando em dois lobos

Comentário:

O ceco em Ambulycini apresenta diferentes graus de desenvolvimento. Apenas em um dos exemplares de *A. schauffelbergeri* analisados foi observado o estado 85:3. (l = 8; ci = 37; ri = 61)

Figura 1.50. Genitália masculina. Edeago em vista lateral. A. *Daphnusa ailanti*, ceco expandido lateralmente (85:3); B. *Cypa decolor*, ceco não projetado (85:0); C. *Barbourion lemaii*, ceco muito projetado (85:1).

86. Fêmea, ântro, esclerotização da parede (Figura 1.51):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Ântro com parede totalmente membranosa foi encontrado apenas em *C. decolor*. Caráter também investigado por Kitching (2002). Aqui ele é não informativo. (l = 1)

87. Fêmea, ântro, esclerotização da parede, extensão (Figura 1.51):

(0) completa

(1) interrompida

Comentário:

Pela topologia de A3, a esclerotização do ântro é interrompida a partir do nó interno 3. Apesar de ter sido considerada completa, a esclerotização do ântro em *Ambulyx* apresenta uma cicatriz longitudinal no lugar da interrupção, que auxilia na identificação da torção do ântro em alguns táxons desse gênero. Caráter também investigado por Kitching (2002). (l = 1; ci = 100; ri = 100)

Figura 1.51. Genitália feminina em vista ventral. A. *Protambulyx strigilis*, interrupção dorsal da esclerotização do ântro vista por transparência; B. *Adhemarius eurysthenes*, seta indica o sentido torção do ântro.

88. Fêmea, ântro, torção (Figura 1.51):

(0) torcido

(1) não torcido

Comentário:

Assim como observado por Kitching (2002), em todos os casos analisados a torção se dá em sentido horário. (l = 5; ci = 20; ri = 50)

89. Fêmea, ântro, torção, intensidade:

(0) torção de aproximadamente 360 graus

(1) pequena rotação, até 90 graus

(2) torção de aproximadamente 180 graus

(3) torção de aproximadamente 270 graus

Comentário:

Esclerotização espiralada da parede do ântro é um dos indicativos de torção. Ao analisar este caráter, Kitching (2002) também observou *gaps* no grau das torções apresentadas em Acherontini. (l = 7; ci = 42; ri = 42)

90. Fêmea, apêndice do ântro (Figura 1.52):

(0) ausente

(1) presente

Comentário:

Segundo Kitching (2002), o *appendix antrum* é um pequeno saco membranoso de parede engrossada posicionado antero-lateralmente ao *colliculum* (esclerotização do ântro). Caráter também investigado por este autor. (l = 2; ci = 50; ri = 75)

91. Fêmea, lamela pós-vaginal, esclerotização, extensão (Figura 1.52):

(0) como uma placa de esclerotização contínua

(1) com menor grau de esclerotização na região mediana, aparentando ser interrompida nessa região

Comentário:

À parte as espécies de *Ambulyx*, a maioria dos Ambulycini apresentem uma lamela pós-vaginal sutilmente esclerotizada. (l = 3; ci = 33; ri = 71)

Figura 1.52. Genitália feminina. Lamela pós-vaginal e apêndice do ântro. A. *A. pryleri* (91:0); B. *A. davidi*; C. *A. gannascus* (adaptada de Kitching, 2015) (91:1); D. *A. pryleri*, seta indicando a presença do apêndice do ântro. Setas brancas apontam a lamela pós-vaginal.

92. Fêmea, lamela antevaginal, grau de esclerotização (Figura 1.53):

(0) fracamente esclerotizada

(1) fortemente esclerotizada

Comentário:

Pela topologia adotada, houve uma redução drástica do grau de esclerotização da lamela antevaginal a partir do nó interno 3. (l = 2; ci = 50; ri = 75)

93. Fêmea, lamela antevaginal, formato (Figura 1.53):

(0) lobada

(1) sem lobos, em forma de placa

Comentário:

Apesar de se ter optado pela construção utilizada, a diferença entre a lamela antevaginal em forma de placa e a lobada não é qualitativa. Sendo assim, o estado 93:0 possivelmente inclui formas intermediárias, tal como sugerido pelo polimorfismo em *A. schauffelbergeri*. Conquanto aumente o número de autapomorfias, para se estudar melhor a evolução deste caráter, deve-se analisá-lo no formato quantitativo contínuo. (l = 5; ci = 20; ri = 63)

Figura 1.53. Genitália feminina em vista ventral. A. *Akbesia davidi* (93:1); B *Ambulyx pryeri*; C *Protambulyx euryalus* (93:2).

94. Fêmea, apófises, comprimento relativo (Figura 1.54):

(0) posterior com uma vez e meia ou menos o comprimento da anterior

(1) posterior com cerca de duas vezes o comprimento da anterior

Comentário:

Os estados 94:0 e 94:1 são facilmente distinguíveis dentro do nó interno 4. Porém, a separação de um caráter de natureza quantitativa contínua em duas classes de valor é imprecisa e pode ter contribuído para o número de homoplasias apresentado. (l = 3; ci = 33; ri = 77)

Figura 1.54. Genitália feminina em vista lateral. A. *Trogolegnum pseudambulyx* (94:0); B. *Protambulyx euryalus* (94:1). Barras brancas indicam o comprimento relativo entre as apófises.

95. Fêmea, bolsa copulatória, signo (Figura 1.55):

(0) presente

(1) ausente

Comentário:

Caráter não informativo. Apesar de inesperado, devido ao seu importante papel reprodutivo no rompimento do espermatóforo masculino, as fêmeas de *T. pseudambulyx* aparentemente não possuem signos. A ausência de signo também foi observada por Kitching (2002) nas fêmeas de *Psilogramma* Rothschild & Jordan, 1903.

(1 = 1)

96. Fêmea, bolsa copulatória, signo, formato (Figura 1.55):

(0) alongado em forma de carena

(1) bífido com base arredondada

(2) bífido com base reta

(3) oval com pequena fenda

(4) duas faixas longitudinais em paredes opostas

Comentário:

Um signo pequeno e oval é o estado presente em ao menos quatro linhagens distintas dentro de Ambulycini. Se adotada a otimização Acctran na topologia de A3, assume-se que o alongamento do signo ocorreu uma vez no nó interno 3 e foi revertido posteriormente para a forma oval em pelo menos duas ocasiões. Caráter também investigado por Kitching (2002). (1 = 7; ci = 57; ri = 62)

Figura 1.55. Genitália feminina. Bolsa copulatória e signo. A. *Cypa decolor* (96:4); B. *P. strigilis* (96:2); C. *P. astygonus* (96:1); D. *A. davidi* (96:3); E. *A. dariensis*, signo em detalhe; F. *O. l. lycidas* (96:0).

Figura 1.56. Alguns exemplares dos ademeriformes em vista dorsal (metade esquerda) / vista ventral (metade direita). A, *Adhemarius dariensis*. B, *Trogolegnum pseudambulyx*. C, *A. gannascus*. D, *A. ypsilon*. E, *A. sexoculata*. F, *A. tigrina*. G, *Orecta lycidas*. Barras negras correspondem à medida de 1 cm. *A. ypsilon* sem escala, adaptado de Kitching (2015).

Tabela 1.1. Localidades amostradas.

Estado	Reserva/Localidade
Espírito Santo	- Reserva Biológica Augusto Ruschi (ARES)
Rio de Janeiro	- Parque Nacional da Serra dos Órgãos (SORJ) - Fazenda Campestre (FCRJ)
São Paulo	- Estação Biológica da Boraceia (BOSP) - Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi (JASP) - Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (PASP) - Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Santa Virgínia) (SVSP) - Parque Estadual do Rio Turvo (RTSP)
Paraná	- Parque Estadual do Pico Marumbi (PMPR)
Santa Catarina	- Parque Nacional da Serra do Itajaí (SISC)

Tabela 1.2. Espécies neotropicais e o número de indivíduos de Ambulycini coletados em Estados brasileiros.

Espécie	*Localidade				Nº total de indivíduos
	ES	SP	PR	SC	
<i>Adhemarius daphne</i>		3	1	1	5
<i>Adhemarius gagarini</i>		1			1
<i>Adhemarius gannascus</i>		11	2		13
<i>Adhemarius palmeri</i>	2	1	4	2	9
<i>Protambulyx eurycles</i>		4		2	6
<i>Protambulyx strigilis</i>		10			10
<i>Orecta lycidas</i>		4	1		5

* As áreas amostradas foram as mesmas que se encontram na Tabela 1.1.

Tabela 1.3. Inicializadores utilizados para a amplificação dos fragmentos propostos.

Gene	Direção	Nome do inicializador	Inicializador	Tamanho (bp)	Referência
COI	Forward	LCO	5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	658	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)
	Reverse	HCO	5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		
<i>wingless</i>	Forward	LepWg1	5' GAR TGY AAR TGY CAY GGY ATG TCT GG 3'	400	(Brower & DeSalle, 1998)
	Reverse	LepWg2	5' ACT ICG CAR CAC CAR TGG AAT GTR CA 3'		
CAD	Forward	CAD743f	5' GGN GTN ACN ACN GCN TGY TTY GAR CC 3'	850	(Wahlberg & Wheat, 2008)
	Reverse	CAD1028r	5' TTR TTN GGN ARY TGN CCN CCC AT 3'		

Tabela 1.4. Programas utilizados na amplificação dos marcadores moleculares.

	COI		<i>wingless</i>		CAD	
1º passo	1x	94 °C, 2 min	1 x	95 °C, 7 min	1x	95 °C, 5 min
2º passo		94 °C, 1 min		95 °C, 1 min		94 °C, 1 min
3º passo	35x	45 °C, 1 min	35x	50 °C, 1 min	40x	54 °C, 1 min
4º passo		72 °C, 1,5 min		72 °C, 2 min		72 °C, 1,5 min
5º passo	1x	72 °C, 5 min	1 x	72 °C, 10 min	1x	72 °C, 10 min

Tabela 1.5. Códigos de acesso das sequências do GenBank analisadas no presente estudo.

Táxon/Voucher	Gene	Código de acesso
<i>Parum colligata</i> /BC-Hax2059	COI	JN678347.1
<i>Parum colligata</i> /PC0182	CAD	EU479092.1
<i>Parum colligata</i> /PC0182	<i>wingless</i>	EU479530.1
<i>Daphnusa ailanti</i> /BC-Hax0699	COI	JN677876.1
<i>Cypa decolor</i> /BC-Hax2533	COI	JN677853.1
<i>Cypa decolor</i> /CU0110	CAD	EU479042.1
<i>Cypa decolor</i> /CU0110	<i>wingless</i>	EU479477.1
<i>Adhemarius daphne</i> /AG1642	CAD	EU479015.1
<i>Adhemarius daphne</i> /AG1642	<i>wingless</i>	EU479449.1
<i>Adhemarius dariensis</i> /BC-Hax0199	COI	JN677663.1
<i>Adhemarius donysa</i> /BC-Hax0241	COI	JN677665.1
<i>Adhemarius eurythene</i> /BC-Roug1161	COI	JN677666.1
<i>Adhemarius gagarini</i> /NS-RR0007	COI	JN279350.1
<i>Adhemarius gannascus</i> /DHJanzen:06-SRNP-5812	COI	GU151913.1
<i>Adhemarius sexoculata</i> /BC-Hax0228	COI	JN677672.1
<i>Adhemarius tigrina</i> /BC-Hax0251	COI	JN677673.1
<i>Adhemarius ypsilon</i> /DHJanzen:05-SRNP-3030	COI	GU151929.1
<i>Akbesia davidi</i> /BC-Hax3675	COI	JN677687.1
<i>Ambulyx japonica</i> /BC-EMEM0623	COI	JN677706.1
<i>Ambulyx pryori</i> /AYK-04-0601	COI	KF491529.1
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i> /NIBGE_MOT-00968	COI	KC182167.1
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i> /AO2568	CAD	EU479020.1
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i> /AO2568	<i>wingless</i>	EU479454.1
<i>Ambulyx substrigilis</i> /BC-Hax0142	COI	JN677730.1
<i>Ambulyx wildei</i> /USNM:ENT:00704738	COI	HM906492.1
<i>Amplypterus mansonii</i> /BC-Hax0426	COI	JN677743.1
<i>Amplypterus panopus</i> /BC-Hax3144	COI	JN677744.1
<i>Amplypterus panopus</i> /AP0276	CAD	EU479025.1
<i>Amplypterus panopus</i> /AP0276	<i>wingless</i>	EU479460.1
<i>Barbourion lemaii</i> /BC-Hax2474	COI	JN677765.1
<i>Batocnema africanus</i> /BC-Hax3746	COI	JN677770.1
<i>Batocnema africanus</i> /Baaf	CAD	JQ784345.1
<i>Batocnema cocquerelii</i> /BC-Hax3742	COI	JN677771.1
<i>Orecta acuminata</i> /BC-EMEM0131	COI	JN678325.1
<i>Orecta lycidas</i> /BC-DZ 11.644	COI	GU703851.1
<i>Protambulyx astygonus</i> /BC-Hax0275	COI	JN678432.1
<i>Protambulyx euryalus</i> /BC-Hax4095	COI	JN678433.1
<i>Protambulyx euryalus</i> /PE1945	CAD	EU479099.1
<i>Protambulyx euryalus</i> /PE1945	<i>wingless</i>	EU479537.1
<i>Protambulyx eurycles</i> /NS-RR1615	COI	JN279358.1
<i>Protambulyx goeldii</i> /NS-RR0148	COI	JN279355.1
<i>Protambulyx ockendeni</i> /BC-Hax0280	COI	JN678436.1
<i>Protambulyx sulphurea</i> /BC-Hax0278	COI	JN678438.1
<i>Protambulyx strigilis</i> /DHJanzen:08-SRNP-103589	COI	JQ559253.1
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i> /BC-Hax0270	COI	JN678638.1

Tabela 1.6. Número de identificação dos vouchers das análises (ARGE – Argentina, demais siglas conforme Tabela 1.1).

Táxon	Código	Data de coleta	Voucher
<i>Adhemarius daphne</i>	ARGE 1	i.2007	MOL 105
	ARGE 2	ii.2009	MOL 106
	JASP 1	ix.2012	MOL 36
	PMPR 1	x.2013	MOL 56
	SISC 1	iii.2014	MOL 245
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	ARES 1	xi.2012	MOL 145
	ARES 2	xi.2012	MOL 146
	ARES 3	xi.2012	MOL 147
	ARES 4	xi.2012	MOL 148
	ARES 5	xi.2012	MOL 149
	ARES 6	xi.2012	MOL 150
	ARES 7	xi.2012	MOL 152
	ARES 8	xi.2012	MOL 153
	ARES 9	xi.2012	MOL 154
	ARES 10	xi.2012	MOL 155
	ARES 11	xi.2012	MOL 157
	ARES 12	xi.2012	MOL 158
	ARES 13	xi.2012	MOL 159
	ARES 14	xi.2012	MOL 160
	ARES 15	xi.2012	MOL 161
	ARES 16	xi.2012	MOL 162
	FCRJ 1	i.2014	MOL 163
	FCRJ 2	i.2014	MOL 164
	FCRJ 3	i.2014	MOL 165
	FCRJ 4	i.2014	MOL 166
	FCRJ 5	i.2014	MOL 167
	FCRJ 6	i.2014	MOL 168
	FCRJ 7	i.2014	MOL 169
	FCRJ 8	i.2014	MOL 170
	FCRJ 9	i.2014	MOL 171
	FCRJ 10	i.2014	MOL 172
	FCRJ 11	i.2014	MOL 173
	SORJ 1	ii.2013	MOL 44
	SORJ 2	ii.2013	MOL 45
	SORJ 3	ii.2013	MOL 46
	SORJ 4	ii.2013	MOL 47
	SVSP 1	iv.2014	MOL 272
	SVSP 2	iv.2014	MOL 274
	SVSP 3	iv.2014	MOL 275
	SVSP 4	iv.2014	MOL 276
	SVSP 5	iv.2014	MOL 277
	SVSP 6	iv.2014	MOL 278
	SVSP 7	iv.2014	MOL 279
	BOSP 1	viii.2012	MOL 107
	BOSP 2	viii.2012	MOL 108
	BOSP 3	viii.2012	MOL 109
	BOSP 4	viii.2012	MOL 110
	BOSP 5	viii.2012	MOL 111
	BOSP 6	viii.2012	MOL 112

Tabela 1.6. Número de identificação dos vouchers das análises (ARGE – Argentina, demais siglas conforme Tabela 1.1).

Táxon	Código	Data de coleta	Voucher
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	BOSP 7	viii.2012	MOL 113
	BOSP 8	viii.2012	MOL 114
	BOSP 9	viii.2012	MOL 115
	BOSP 10	viii.2012	MOL 116
	BOSP 11	viii.2012	MOL 117
	BOSP 12	viii.2012	MOL 118
	BOSP 13	viii.2012	MOL 119
	BOSP 14	viii.2012	MOL 120
	BOSP 15	viii.2012	MOL 121
	BOSP 16	viii.2012	MOL 122
	BOSP 17	viii.2012	MOL 123
	BOSP 18	viii.2012	MOL 124
	BOSP 19	viii.2012	MOL 125
	BOSP 20	viii.2012	MOL 126
	PASP 1	xii.2013	MOL 95
	JASP 1	viii-ix.2012	MOL 27
	JASP 2	viii-ix.2012	MOL 29
	JASP 3	viii-ix.2012	MOL 30
	JASP 4	viii-ix.2012	MOL 31
	JASP 5	viii-ix.2012	MOL 37
	JASP 6	iii.2013	MOL 59
	JASP 7	iii.2013	MOL 60
	JASP 8	iii.2013	MOL 61
	JASP 9	iii.2013	MOL 62
	JASP 10	iii.2013	MOL 63
	JASP 11	iii.2013	MOL 64
	JASP 12	iii.2013	MOL 65
	JASP 13	iii.2013	MOL 66
	JASP 14	iii.2013	MOL 67
	JASP 15	iii.2013	MOL 68
	JASP 16	iii.2013	MOL 69
	JASP 17	iii.2013	MOL 70
	RTSP 1	xii.2013	MOL 319
	RTSP 2	xii.2013	MOL 320
	RTSP 3	xii.2013	MOL 321
	RTSP 4	xii.2013	MOL 322
	RTSP 5	xii.2013	MOL 323
	RTSP 6	xii.2013	MOL 324
	RTSP 7	xii.2013	MOL 325
	PMPR 1	ix.2013	MOL 80
	PMPR 2	ix.2013	MOL 81
	PMPR 3	ix.2013	MOL 82
	PMPR 4	ix.2013	MOL 83
	PMPR 5	ix.2013	MOL 84
	PMPR 6	ix.2013	MOL 85
	PMPR 7	ix.2013	MOL 86
	PMPR 8	ix.2013	MOL 87
	PMPR 9	iii.2014	MOL 97
	PMPR 10	iii.2014	MOL 99

Tabela 1.6. Número de identificação dos vouchers das análises (ARGE – Argentina, demais siglas conforme Tabela 1.1).

Táxon	Código	Data de coleta	Voucher
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	PMPR 11	iii.2014	MOL 178
	PMPR 12	iii.2014	MOL 225
	PMPR 13	iii.2014	MOL 226
	PMPR 14	iii.2014	MOL 228
	PMPR 15	iii.2014	MOL 229
	PMPR 16	iii.2014	MOL 230
	PMPR 17	iii.2014	MOL 231
	PMPR 18	iii.2014	MOL 232
	SISC 1	x.2013	MOL 88
	SISC 2	x.2013	MOL 89
	SISC 3	x.2013	MOL 90
	SISC 4	x.2013	MOL 91
	SISC 5	x.2013	MOL 92
	SISC 6	x.2013	MOL 93
	SISC 7	iii.2014	MOL 246
	SISC 8	iii.2014	MOL 247
<i>Adhemarius gagarini</i>	SVSP 1	iv.2014	MOL 273
<i>Adhemarius gannascus</i>	BOSP 1	iii.2013	MOL 48
	BOSP 2	x.2012	MOL 133
	JASP 1	iii.2013	MOL 140
	JASP 2	ix.2012	MOL 34
	PMPR 1	ix.2013	MOL 51
<i>Adhemarius palmeri</i>	ARES 1	xi.2012	MOL 151
	SVSP 1	iv.2014	MOL 300
	PMPR 1	ix.2013	MOL 52
	PMPR 2	x.2013	MOL 57
	SISC 1	x.2013	MOL 71
<i>Orecta lycidas</i>	BOSP 1	i.2013	MOL 42
	BOSP 2	ix.2012	MOL 129
	JASP 1	i.2013	MOL 25
	JASP 2	iii.2013	MOL 143
	PMPR 1	ix.2013	MOL 50
<i>Protambulyx eurycles</i>	BOSP 1	i.2013	MOL 43
	BOSP 2	iv.2013	MOL 49
	BOSP 3	xi.2012	MOL 135
	SISC 1	x.2013	MOL 58
<i>Protambulyx strigilis</i>	BOSP 1	x.2012	MOL 132
	JASP 1	viii.2012	MOL 28

Tabela 1.7. Relação de táxons estudados com os exemplares obtidos como empréstimo e o número de genitálias analisadas. Siglas das coleções conforme seção 2.1.

	Gênero	Espécie	Autor	Empréstimo				Genitálias estudadas	
				MNHN	MNRJ	NMNH	ZSM	♂	♀
Grupo Interno	<i>Adhemarius</i> (17 spp.)	<i>daphne</i>	(Boisduval, [1875])			2		3	2
		<i>dariensis</i>	(Rothschild & Jordan, 1916)			2		2	1
		<i>donyssa</i>	(Druce, 1889)	2				1	-
		<i>eurysthenes</i>	(R. Felder, [1874])					2	1
		<i>gagarini</i>	(Zikan, 1935)					2	-
		<i>gannascus</i>	(Stoll, 1790)					1	2
		<i>palmeri</i>	(Boisduval, [1875])	2			2	2	1
		<i>sexoculata</i>	(Grote, 1867)			1		1	1
		<i>tigrina</i>	(R. Felder, 1874)	2		1	2	2	1
	<i>Akbesia</i>	<i>davidi</i>	(Oberthür, 1884)					1	1
	<i>Ambulyx</i> (49 spp.)	<i>japonica</i>	Rothschild, 1894			1		1	-
		<i>pryeri</i>	Distant, 1887	1				1	1
		<i>schauffelbergeri</i>	(Bremer & Grey, 1853)	2		1	2	1	2
		<i>substrigilis</i>	(Westwood, 1847)	1		2		1	1
		<i>wildei</i>	Miskin, 1891					1	-
	<i>Amplipterus</i> (2 spp.)	<i>panopus</i>	(Cramer, [1779])	2			2	1	1
	<i>Barbourion</i>	<i>lemaii</i>	(le Moul, 1933)					1	-
	<i>Batocnema</i> (2 spp.)	<i>africanus</i>	(Distant, 1899)			2		1	-
		<i>cocquerelii</i>	(Boisduval, [1875])			1		1	1
	<i>Compsulyx</i>	<i>cochereaui</i>	(Viette, 1971)			2		1	-
	<i>Orecta</i> (5 spp.)	<i>acuminata</i>	B. P. Clark, 1923			1		1	-
		<i>lycidas eos</i>	(Burmeister, 1875)			2		-	1
		<i>lycidas lycidas</i>	(Boisduval, [1875])					1	2

Tabela 1.7. Relação de táxons estudados com os exemplares obtidos como empréstimo e o número de genitálias analisadas. Siglas das coleções conforme seção 2.1.

	Gênero	Espécie	Autor	Empréstimo				Genitálias estudadas	
				MNHN	MNRJ	NMNH	ZSM	♂	♀
Grupo Interno		<i>astygonus</i>	(Boisduval, [1875])				1	1	2
		<i>carteri</i>	Rothschild & Jordan, 1903	2		2		1	1
		<i>euryalus</i>	Rothschild & Jordan, 1903				3	1	1
	<i>Protambulyx</i> (8 spp.)	<i>eurycles</i>	(Herrich-Schäffer, [1855])	2				1	1
		<i>goeldii</i>	Rothschild & Jordan, 1903	1		1	1	1	1
		<i>ockendeni</i>	Rothschild & Jordan, 1903			1		1	-
		<i>strigilis</i>	(Linnaeus, 1771)					1	1
		<i>sulphurea</i>	(Rothschild, 1894)		4			2	1
Grupo Externo	<i>Trogolegnum</i>	<i>pseudambulyx</i>	(Boisduval, [1875])			1	1	1	1
	<i>Cypa</i> (10 spp.)	<i>decolor</i>	(Walker, 1856)			2		1	1
	<i>Daphnusa</i> (6 spp.)	<i>ailanti</i>	(Boisduval, [1875])			2		1	-
	<i>Parum</i>	<i>colligata</i>	(Walker, 1856)			2		2	1

Tabela 1.8. Genitálias estudadas. Acrônimos das coleções conforme seção 2.1.

Táxon	Localidade	Sexo	Coleção	Voucher
<i>A. daphne</i>	Timbó – SC/BR	♂	MZUSP	LWC2012:05
	Costa Rica	♂	NMNH	LWC2012:21
	Costa Rica	♂	NMNH	LWC2012:22
	Timbó – SC/BR	♀	MZUSP	LWC2012:05
	Salesópolis – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:28
<i>A. dariensis</i>	Zacapa – Guatemala	♂	MZUSP	LWC2012:12
<i>A. eurysthenes</i>	Salesópolis – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:01
	Salesópolis – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:02
	Salesópolis – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:01
<i>A. gagarini</i>	Salesópolis – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:10
	S. L. Paraitinga – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:40
<i>A. gannascus</i>	Timbó – SC/BR	♂	MZUSP	LWC2012:03
	Salesópolis – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:02
	Timbó – SC/BR	♀	MZUSP	LWC2012:29
<i>A. palmeri</i>	Salesópolis – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:06
	Morretes – PR/BR	♂	MZUSP	LWC2012:38
	Timbó – SC/BR	♀	MZUSP	LWC2012:06
<i>A. sexoculata</i>	Equador	♂	MZUSP	LWC2012:17
	Bogotá – Colômbia	♀	NMNH	LWC2012:13
<i>A. tigrina</i>	Peru	♂	MZUSP	LWC2012:18
	Peru	♂	MZUSP	LWC2012:41
	Aragua - Venezuela	♀	NMNH	LWC2012:11
<i>A. davidi</i>	Turquia	♂	MZUSP	LWC2012:33
	Turquia	♀	MZUSP	LWC2012:23
<i>A. japonica</i>	Japão	♂	NMNH	LWC2012:23
<i>A. pryeri</i>	Malásia	♂	MZUSP	LWC2012:15
	Malásia	♀	MZUSP	LWC2012:10
<i>A. schauffelbergeri</i>	Taiwan	♂	ZSM	LWC2012:37
	Taiwan	♀	NMNH	LWC2012:17

Tabela 1.8. Genitálias estudadas. Acrônimos das coleções conforme seção 2.1.

Táxon	Localidade	Sexo	Coleção	Voucher
	China	♀	MNHN	LWC2012:26
<i>A. substrigilis</i>	Filipinas	♂	NMNH	LWC2012:26
	Filipinas	♀	NMNH	LWC2012:19
<i>A. wildei</i>	sem informação	♂	MZUSP	LWC2012:14
<i>A. panopus</i>	Filipinas	♂	MZUSP	LWC2012:16
	Java	♀	NMNH	LWC2012:21
<i>B. lemaii</i>	Tailândia	♂	MZUSP	LWC2012:34
<i>B. africanus</i>	África do Sul	♂	NMNH	LWC2012:25
<i>B. cocquerelii</i>	Madagascar	♂	MZUSP	LWC2012:19
	Madagascar	♀	NMNH	LWC2012:12
<i>C. cochereaui</i>	Nova Caledônia	♂	NMHN	LWC2012:27
<i>O. acuminata</i>	Tucuman – Argentina	♂	NMNH	LWC2012:36
<i>O. lycidas eos</i>	sem informação	♀	NMNH	LWC2012:18
<i>O. lycidas lycidas</i>	C. do Jordão – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:09
	Rio Vermelho – SC/BR	♀	MZUSP	LWC2012:04
	Ponta Grossa – PR/BR	♀	MZUSP	LWC2012:22
<i>P. astygonus</i>	Anhembi – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:07
	Anhembi – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:07
	Anhembi – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:09
<i>P. carteri</i>	Cuba	♂	NMNH	LWC2012:29
	Matanzas - Cuba	♀	NMNH	LWC2012:16
<i>P. euryalus</i>	Cosñipata Valley -Peru	♂	MZUSP	LWC2012:11
	Bolívia	♀	MZUSP	LWC2012:25
<i>P. eurycles</i>	Juquiá – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:08
	Rio Vermelho – SC/BR	♀	MZUSP	LWC2012:08
<i>P. goeldii</i>	Guiana Francesa	♂	MZUSP	LWC2012:13
	Guiana Francesa	♀	NMNH	LWC2012:15

Tabela 1.8. Genitálias estudadas. Acrônimos das coleções conforme seção 2.1.

Táxon	Localidade	Sexo	Coleção	Voucher
<i>P. ockendeni</i>	República Dominicana	♂	NMNH	LWC2012:30
<i>P. strigilis</i>	Salesópolis – SP/BR	♂	MZUSP	LWC2012:04
	Salesópolis – SP/BR	♀	MZUSP	LWC2012:03
<i>P. sulphurea</i>	Caracas - Venezuela	♂	NMNH	LWC2012:24
	Guapimirim – RJ/BR	♂	MNRJ	LWC2012:35
	Guapimirim – RJ/BR	♀	MNRJ	LWC2012:24
<i>T.</i>	Oaxaca - México	♂	MZUSP	LWC2012:20
<i>pseudambulyx</i>	Hidalgo - México	♀	NMNH	LWC2012:14
<i>C. decolor</i>	Malásia	♂	NMNH	LWC2012:28
	Indonésia	♀	NMNH	LWC2012:20
<i>D. ailanti</i>	Sumatra	♂	NMNH	LWC2012:31
<i>P. colligata</i>	Chengtu – China	♂	NMNH	LWC2012:32
	China	♂	NMNH	LWC2012:39
	China	♀	NMNH	LWC2012:27

Tabela 1.9. Plantas hospedeiras das larvas dos táxons analisados. Informações sobre a distribuição geográfica obtidas de etiquetas e referências eletrônicas (Oehlke, 2000; Pittaway, 2015; Pittaway & Kitching, 2015; Kitching, 2015). Nomenclatura das famílias de plantas hospedeiras segue o site www.tropicos.org.

Táxon	Planta hospedeira	Referência	Distribuição geográfica
<i>A. daphne</i>	Lauraceae	(Janzen & Hallwachs, 2000; Oehlke, 2000)	Do México à Argentina
<i>A. dariensis</i>	provavelmente Lauraceae	(Oehlke, 2000)	América Central
<i>A. donysa</i>	desconhecida	-	América Central
<i>A. eurysthenes</i>	provavelmente Lauraceae	(Oehlke, 2000)	Do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul e Paraguai
<i>A. gagarini</i>	desconhecida	-	Da Venezuela a São Paulo
<i>A. gannascus</i>	Lauraceae	(Janzen & Hallwachs, 2000)	Do México à Argentina
<i>A. palmeri</i>	provavelmente Lauraceae	(Oehlke, 2000)	Da Colômbia à Argentina
<i>A. sexoculata</i>	provavelmente Lauraceae	(Oehlke, 2000)	Países do Bioma Amazônico
<i>A. tigrina</i>	provavelmente Lauraceae	(Oehlke, 2000)	Da Venezuela à Bolívia, próximo aos Andes
<i>A. ypsilon</i>	Lauraceae	(Janzen & Hallwachs, 2000)	Do México à Bolívia
<i>A. davidi</i>	Anacardiaceae	(De Freina & Geck, 2003; Müller <i>et al.</i> , 2005)	Nordeste do Afeganistão ao centro-sul da Turquia
<i>A. japonica</i>	Aceraceae, Betulaceae	(Inoue <i>et al.</i> , 1982), (Nakamura, 1977)	Japão
<i>A. pryeri</i>	Apocynaceae	(Robinson <i>et al.</i> , 2009)	Arquipélago Malaio
<i>A. schauffelbergeri</i>	Juglandaceae	(Wang, 1990)	Sudeste Asiático e Japão
<i>A. substrigilis</i>	Meliaceae, Dipterocarpaceae	(Robinson <i>et al.</i> , 2009; Bell & Scott, 1937)	Índia e Indochina
<i>A. wildei</i>	desconhecida	-	Nordeste da Austrália e Papua-Nova Guiné
<i>A. panopus</i>	Anacardiaceae, Malvaceae, Clusiaceae, Calophyllaceae	(Robinson <i>et al.</i> , 2009; Bell & Scott, 1937)	Índia, Indochina e Sudeste da China
<i>B. lemai</i>	desconhecida	-	Sudoeste da China e Indochina
<i>B. africanus</i>	Anacardiaceae	(Pinhey, 1962)	Do Quênia à África do Sul
<i>B. cocquerelii</i>	Anacardiaceae	(Matyot, 2005)	Madagascar
<i>C. cochereaui</i>	desconhecido	-	Nova Caledônia

Tabela 1.9. Plantas hospedeiras das larvas dos táxons analisados. Informações sobre a distribuição geográfica obtidas de etiquetas e referências eletrônicas (Oehlke, 2000; Pittaway, 2015; Pittaway & Kitching, 2015; Kitching, 2015). Nomenclatura das famílias de plantas hospedeiras segue o site www.tropicos.org.

Táxon	Planta hospedeira	Referência	Distribuição geográfica
<i>O. acuminata</i>	desconhecido	-	Argentina
<i>O. lycidas lycidas</i>	Lauraceae	(Zikán, 1928)	Do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul
<i>P. astygonus</i>	desconhecida	-	Sudeste do Brasil ao Paraguai e Bolívia
<i>P. carteri</i>	Anacardiaceae	(Oehlke, 2000)	Flórida e Bahamas
<i>P. euryalus</i>	Anacardiaceae	(Oehlke, 2000)	Da Venezuela à Bolívia
<i>P. eurycles</i>	Anacardiaceae e Simaroubaceae	(Oehlke, 2000)	Do México a Santa Catarina
<i>P. goeldii</i>	provavelmente Anacardiaceae	-	Da Nicarágua à Bolívia e Guiana Francesa ao Pará (BR)
<i>P. ockendeni</i>	Anacardiaceae	(Oehlke, 2000)	Peru, Bolívia e Ecuador
<i>P. strigilis</i>	Anacardiaceae, Simaroubaceae, Proteaceae	(Tuttle, 2007; Janzen & Hallwachs, 2000)	Toda América Central e maior parte da América do Sul até a Argentina
<i>P. sulphurea</i>	provavelmente Anacardiaceae	-	Venezuela, Guiana Francesa e Rio de Janeiro
<i>T. pseudambulyx</i>	provavelmente Lauraceae	-	México
<i>C. decolor</i>	Fagaceae, Betulaceae, Dipterocarpaceae	(Inoue, Kennett & Kitching, [1996] 1997; Robinson <i>et al.</i> , 2009)	Índia, Indochina, China e Arquipélago Malaio
<i>D. ailanti</i>	Sapindaceae, Malvaceae	(para <i>D. ocellaris</i> - Inoue, Kennett & Kitching, [1996] 1997)	Arquipélago Malaio
<i>P. colligata</i>	Moraceae	(Mell, 1922; Lin, 2000; Eitschberger & Ihle, 2008; Pittaway & Kitching, 2015)	Do nordeste da China à Indochina e Japão

Tabela 1.10. Matriz de caracteres morfológicos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Parum colligata</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	2	?	0	0	1	2	0	0	0	1	0
<i>Daphnusa ailanti</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0
<i>Cypa decolor</i>	1	0	0	1	0	1	1	1	-	2	?	0	1	0	-	0	0	0	1	0
<i>Adhemarius daphne</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Adhemarius dariensis</i>	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>Adhemarius donysa</i>	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>Adhemarius eurysthene</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Adhemarius gagarini</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Adhemarius gannascus</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Adhemarius palmeri</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Adhemarius sexoculata</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>Adhemarius tigrina</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>Orecta acuminata</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
<i>Orecta lycidas eos</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
<i>Protambulyx astygonus</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx carteri</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx euryalus</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx eurycles</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx goeldii</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx ockendeni</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx strigilis</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Protambulyx sulphurea</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i>	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Akbesia davidi</i>	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
<i>Ambulyx japonica</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Ambulyx pryori</i>	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i>	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Ambulyx substrigilis</i>	0	2	1	?	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Ambulyx wildei</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>Amplipterus panopus</i>	0	?	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	?	0	0	0	0	0
<i>Barbourion lemaii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	?	?	0	-	0	0	0	0	0
<i>Batocnema africanus</i>	0	2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
<i>Batocnema cocquerelii</i>	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
<i>Compsulyx cochereaui</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	-	0	0	0	0	0

Tabela 1.10. Continuação.

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<i>Parum colligata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	-	0	-	0	-	-	0	1
<i>Daphnusa ailanti</i>	0	1	0	1	0	0	1	1	0	-	0	0	-	0	-	0	-	-	0	1
<i>Cypa decolor</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	-	0	-	0	-	-	0	1
<i>Adhemarius daphne</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	2	0	1
<i>Adhemarius dariensis</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	-	1	0	1	0	1	0	2
<i>Adhemarius donysa</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	-	1	0	1	0	1	0	2
<i>Adhemarius eurythenes</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	1	0	1
<i>Adhemarius gagarini</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	1	0	1
<i>Adhemarius gannascus</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	2	0	1
<i>Adhemarius palmeri</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1	0	1	0	1
<i>Adhemarius sexoculata</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	-	0	0	-	1	1	1	0	1	0	1
<i>Adhemarius tigrina</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	-	0	1	2	1	1	1	0	1	0	1
<i>Orecta acuminata</i>	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	0	1	2	?	?	1	0	?	0	0
<i>Orecta lycidas eos</i>	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	0	?	?	?	?	?	?	?	0	0
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	0	1	2	1	1	1	0	1	0	0
<i>Protambulyx astygonus</i>	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx carteri</i>	2	1	2	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx euryalus</i>	2	1	2	0	1	0	1	1	1	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx eurycles</i>	2	1	2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx goeldii</i>	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx ockendeni</i>	2	1	?	0	1	?	1	1	1	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx strigilis</i>	2	1	2	0	1	1	1	1	1	0	0	1	3	1	1	1	0	0	0	1
<i>Protambulyx sulphurea</i>	2	1	2	0	1	0	0	1	0	-	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i>	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	-	1	0	1	0	1	0	1
<i>Akbesia davidi</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	-	0	0	-	1	1	1	1	-	0	1
<i>Ambulyx japonica</i>	1	1	2	1	0	0	1	1	1	0	1	1	2	0&1	0	1	1	-	1	1
<i>Ambulyx pryeri</i>	1	1	0&2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	2	1	0	1	1	-	1	1
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	0	-	1	0	-	1	0	1	1	-	1	1
<i>Ambulyx substrigilis</i>	1	1	2	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	-	1	1
<i>Ambulyx wildei</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	2	1	0	1	1	-	1	1
<i>Amplypterus panopus</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	-	0	1
<i>Barbourion lemaii</i>	2	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	-	0	-	1	1	-	0	1
<i>Batocnema africanus</i>	2	1	0	1	0	0	0	1	0	-	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>Batocnema cocquerelii</i>	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>Compsulyx cochereaui</i>	1	1	2	1	1	0	0	1	0	-	0	0	-	?	?	0	-	-	0	1

Tabela 1.10. Continuação.

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
<i>Parum colligata</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	-	0	1	1	0	0	-	0	0	0
<i>Daphnusa ailanti</i>	0	1	?	?	?	?	?	0	0	1	0	0	1	1	1	0	-	0	0	0
<i>Cypa decolor</i>	0	1	?	?	?	?	?	0	0	0	-	0	1	1	1	0	-	0	0	0
<i>Adhemarius daphne</i>	0	0	0&1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2
<i>Adhemarius dariensis</i>	0	0	1	0	-	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2
<i>Adhemarius donysa</i>	0	0	1	0	-	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2
<i>Adhemarius eurythenes</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	2
<i>Adhemarius gagarini</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2
<i>Adhemarius gannascus</i>	0	0	0&1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2
<i>Adhemarius palmeri</i>	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	2
<i>Adhemarius sexoculata</i>	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	-	1	1	1&2
<i>Adhemarius tigrina</i>	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	-	1	1	1
<i>Orecta acuminata</i>	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	-	1	1	3
<i>Orecta lycidas eos</i>	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	-	1	1	3
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	-	1	1	3
<i>Protambulyx astygonus</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx carteri</i>	0	0	1	1	1	1	?	0	0	1	0	1	1	?	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx euryalus</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx eurycles</i>	1	0	1	1	2	0	0&1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx goeldii</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx ockendeni</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx strigilis</i>	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0&1	0	0	-	0	1	1
<i>Protambulyx sulphurea</i>	1	1	?	?	?	?	?	0	0	1	0	0	0	-	0	0	-	0	1	1
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	1	1	0	1	0	-	1	1	1	1	1	2
<i>Akbesia davidi</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	0	1	0	1	0	-	1	0	-	1	1	1
<i>Ambulyx japonica</i>	0	0	0	-	-	-	-	0	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1
<i>Ambulyx pryeri</i>	0	0	1	0&1	-	1	1	0	0	1	0	1	0	-	0	0	-	1	1	1
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i>	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	-	1	1	1
<i>Ambulyx substrigilis</i>	0	0	1	0	-	1	1	0	0	1	0	1	0	-	0	0	-	1	1	1
<i>Ambulyx wildei</i>	0	0	1	0	-	1	1	0	0	1	0	1	0	-	0	0	-	1	1	1
<i>Amplipterus panopus</i>	0	0	0	-	-	-	-	1	1	0	-	1	1	1	0	0	-	0	1	2
<i>Barbourion lemaii</i>	0	1	?	?	?	?	?	0	0	1	0	0	1	1	1	0	-	1	0	0
<i>Batocnema africanus</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	-	1	0	-	0	1	1
<i>Batocnema cocquerelii</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-	0	0	-	0	1	1
<i>Compsulyx cochereaui</i>	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	-	0	1	1

Tabela 1.10. Continuação.

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
<i>Parum colligata</i>	0	1	0	0	1	-	1	1	0	0	1	-	0	0	1	2	0	0	0	2
<i>Daphnusa ailanti</i>	1	2	1	?	0	1	1	-	0	0	1	-	?	?	?	?	1	0	0	3
<i>Cypa decolor</i>	0	0	2	?	1	-	0	-	0	0	1	-	1	-	-	-	1	0	0	1
<i>Adhemarius daphne</i>	0	2	0	1	0	2	0	-	1	0	0	0	0	2	1	2	1	0	1	0
<i>Adhemarius dariensis</i>	0	2	0	1	0	2	0	-	1	0	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0
<i>Adhemarius donysa</i>	0	1	0	1	0	2	0	-	1	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0
<i>Adhemarius eurythenes</i>	1	2	0	1	0	0	0	-	1	0	1	-	0	0	1	2	1	0	1	0
<i>Adhemarius gagarini</i>	0	2	0	1	0	0/2	0	-	1	0	0	0	0	2	1	2	1	0	1	0
<i>Adhemarius gannascus</i>	0	2	0	1	0	0	0	-	1	0	0	1	0	2	1	2	1	0	1	0
<i>Adhemarius palmeri</i>	1	2	0	1	0	0	0	-	1	0	1	-	0	0	1	2	1	0	1	0
<i>Adhemarius sexoculata</i>	0	2	0	1	0	2	0	-	1	0	0	1	0	2	1	2	1	0	0	0
<i>Adhemarius tigrina</i>	0	2	0	1	0	0	0	-	1	0	0	1	0	2	1	2	1	0	0	0
<i>Orecta acuminata</i>	0	1	0	1	0	0	0	-	0	0	0/1	?	0	3	1	0	1	0	1	0
<i>Orecta lycidas eos</i>	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	0	0	0	1	0	0	0	-	0	?	0/1	?	0	3	1	0	1	0	0	0
<i>Protambulyx astygonus</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1
<i>Protambulyx carteri</i>	?	0	0	1	0	1	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2
<i>Protambulyx euryalus</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2
<i>Protambulyx eurycles</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2
<i>Protambulyx goeldii</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1
<i>Protambulyx ockendeni</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
<i>Protambulyx strigilis</i>	1	0	0	1	0	1	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2
<i>Protambulyx sulphurea</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i>	0	0	0	1	0	2	0	-	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0
<i>Akbesia davidi</i>	1	0	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Ambulyx japonica</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	-	0	0	0	2
<i>Ambulyx pryeri</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	-	0	0	0	-	0	1	1	2
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i>	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	-	0	1	0	-	1	0	1	2
<i>Ambulyx substrigilis</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0/1	0	0	1	0	-	0	1	1	2
<i>Ambulyx wildei</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	-	0	1	0	-	0	1	1	2
<i>Amplipterus panopus</i>	1	2	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	1	0	-	1	0	0	1
<i>Barbourion lemaii</i>	0	0	0	0	1	-	1	0/1	?	0	1	-	0	4	0	-	1	0	0	0
<i>Batocnema africanus</i>	1	1	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0
<i>Batocnema cocquerelii</i>	1	1	0	1	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0
<i>Compsulyx cochereaui</i>	1	2	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0

Tabela 1.10. Continuação.

	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
<i>Parum colligata</i>	1	0	-	0	3	1	0	0	-	0	0	1	1	0	0	3
<i>Daphnusa ailanti</i>	1	0	-	0	3	1	0	?	?	?	1	1	1	0	?	?
<i>Cypa decolor</i>	0	-	-	-	0	0	-	?	?	0	0	1	1	0	0	4
<i>Adhemarius daphne</i>	1	1	1	0	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Adhemarius dariensis</i>	1	1	2	0	2	1	1	0	-	0	0	0	1	0	0	3
<i>Adhemarius donysa</i>	1	1	1	0	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	1	1	0	0	2	1	1	1	2	0	1	0	1	0	0	1
<i>Adhemarius gagarini</i>	1	1	0	0	2	1	1	1	?	0	1	0	1	0	0	1
<i>Adhemarius gannascus</i>	1	1	1	0	2	1	1	1	3	0	1	0	0/1	0	0	1
<i>Adhemarius palmeri</i>	1	1	0	0	2	1	1	1	3	0	1	0	1	0	0	1
<i>Adhemarius sexoculata</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
<i>Adhemarius tigrina</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	3	0	1	0	1	1	0	1
<i>Orecta acuminata</i>	1	1	2	0	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Orecta lycidas eos</i>	1	?	?	?	?	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	?
<i>Orecta lycidas lycidas</i>	1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Protambulyx astygonus</i>	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>Protambulyx carteri</i>	1	1	1	0	2	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	?
<i>Protambulyx euryalus</i>	1	1	1	0	2	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	1
<i>Protambulyx eurycles</i>	1	1	1	0	2	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	1
<i>Protambulyx goeldii</i>	1	1	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>Protambulyx ockendeni</i>	1	1	1	0	0	1	?	0	-	0	0	0	0	1	0	1
<i>Protambulyx strigilis</i>	1	1	1	0	2	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	2
<i>Protambulyx sulphurea</i>	1	1	2	0	2	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	1
<i>Trogolegnum pseudambulyx</i>	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	-
<i>Akbesia davidi</i>	1	2	?	0	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3
<i>Ambulyx japonica</i>	1	1	?	1	1	1	0	1	?	?	0	0/1	1	0/1	0	3
<i>Ambulyx pryeri</i>	1	1	2	1	1	1	0	1	3	1	0	1	0	0	0	3
<i>Ambulyx schauffelbergeri</i>	1	1	2	1	1/3	1	0	1	0	1	0	1	0/1	0/1	0	3
<i>Ambulyx substrigilis</i>	1	1	2	1	1	1	0	1	3	1	0	0/1	0	0	0	3
<i>Ambulyx wildei</i>	1	1	2	1	1	1	0	1	?	1	0	0	1	0/1	0	3
<i>Amphypterus panopus</i>	1	1	2	0	2	1	1	1	3	0	0	0	1	0	0	1
<i>Barbourion lemaii</i>	1	1	2	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Batocnema africanus</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	?	1	0	0	0	0	0/1	?
<i>Batocnema cocquerelii</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	3
<i>Compsulyx cochereau</i>	1	2	?	0	0	1	1	0	-	0	0	0	1	0	?	?

Capítulo 2

***Adhemarius eurysthenes* (Felder, [1874]) e a Mata Atlântica: uma perspectiva filogeográfica**

Resumo

Devido a vários fatores relacionados ao desenvolvimento econômico, o bioma Mata Atlântica tem sofrido forte impacto da ação humana. *Adhemarius eurysthenes* é uma espécie de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae) endêmica da porção sul desse bioma, com a maior parte de suas populações em território brasileiro. Usando-se principalmente a região barcode do gene COI, foram analisadas filogeograficamente algumas populações de *A. eurysthenes*, para a obtenção de informações sobre a estrutura e a variabilidade genética com o objetivo de explicar sua distribuição espacial. Foram obtidos 14 haplótipos de 109 indivíduos distribuídos em 10 localidades. A localidade do Espírito Santo foi aquela com maior distância genética média em relação às demais populações. Concordantemente, o teste de variância molecular que inclui o componente espacial separou as amostras em dois grupos, onde o Espírito Santo foi também a localidade divergente das demais. Não obstante, nenhuma correlação foi obtida entre a variação genética e a distância geográfica. Desse modo, pode ser observada uma tendência de isolamento genético no limite norte da distribuição dessa espécie. De posse desses resultados, discute-se a transposição dos padrões encontrados para outros táxons na tentativa de subsidiar estudos de conservação dos Ambulycini na Mata Atlântica. Consequentemente, o Espírito Santo passa a ser uma localidade de particular importância para a conservação de espécies de Ambulycini endêmicas deste bioma, como *A. eurysthenes* e *O. lycidas*.

1. Introdução

1.1. Mata Atlântica

Há cerca de 50 milhões de anos atrás, as florestas úmidas do continente americano provavelmente ocuparam, do Pacífico ao Atlântico, quase todo o seu território. Foi por volta de cinco milhões de anos atrás, com a expansão das áreas abertas savânicas, representadas na América do Sul pela Caatinga, o Cerrado e o Chaco,

que fatalmente se deu o isolamento de grandes formações de florestas do tipo úmido (Da Silva & Pinto-da-Rocha, 2011). A Mata Atlântica na região costeira evoluiu adaptada ao clima quente e úmido, favorecido pelas correntes do oceano Atlântico e pelo seu posicionamento em relação à linha do Equador. Devido à sua ampla distribuição, existe hoje uma enorme variação nas suas características definindo suas diversas fitofisionomias, da mais úmida no litoral, à mais seca no interior (Da Silva & Pinto-da-Rocha, 2011). Essa vegetação ocupava originalmente quase toda a costa leste da América do Sul, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul em solo brasileiro, estendendo-se ao leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Di Bitetti *et al.*, 2003; Da Silva & Pinto-da-Rocha, 2011).

A Mata Atlântica *sensu lato* é caracterizada pela forte sazonalidade, pela complexa topografia e por uma precipitação causada principalmente pelo efeito orográfico (IBGE, 1993). Este é o bioma mais ameaçado do Brasil, restando em torno de 13% de remanescentes florestais acima de 3 ha, e apenas 8,5% de fragmentos com mais de 100 ha (INPE, 2013). Cerca de 70% de todo o território do Estado de São Paulo foi originalmente composto pelo bioma da Mata Atlântica. Apesar dessa porcentagem ter diminuído drasticamente, São Paulo é um dos Estados, ao lado do Paraná, onde se encontram os maiores remanescentes de florestas (Scaramuzza, 2011).

Historicamente, após a colonização europeia a partir do ano de 1500, a ocupação do território brasileiro se deu principalmente pela costa. Assim, a maioria dos Estados atuais possui a capital no bioma da Mata Atlântica, indicando forte polarização no desenvolvimento nacional. Devido aos ciclos econômicos do desenvolvimento brasileiro e seu sistema desigual de distribuição de terras, à expansão dos centros urbanos e ao crescimento populacional desordenado, o bioma Mata Atlântica tem sofrido forte impacto de natureza antrópica (Galindo-Leal & Câmara, 2005). Culturas intensivas de soja e o reflorestamento por *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. são apontadas como as formas mais recentes de impacto (Galindo-Leal & Câmara, 2005). Atualmente, sua área de abrangência apresenta a maior densidade populacional, comparada aos demais biomas brasileiros, e é a principal região de atividades econômicas do país (IBGE, 2011). Tal cenário resultou em uma modificação da paisagem, com a perda de habitats e a formação de fragmentos reduzidos de vegetação nativa, ilhando as populações de diversas espécies selvagens. Consequentemente, muitas dessas populações diminuíram, influenciadas pelo aumento do efeito de borda,

diminuição da dispersão e da migração (Tabarelli *et al.*, 1999; Rambaldi & Oliveira, 2003). Com isso, espécies têm desaparecido de regiões onde outrora podiam ser encontradas. O intenso desmatamento registrado para Minas Gerais (INPE, 2012), por exemplo, pode ser um dos responsáveis pela diminuta série de exemplares de *Orecta lycidas lycidas* (Boisduval, [1875]) da região leste do Estado (Zikán, 1929; A. Soares, comunicação pessoal; Coleção de Lepidoptera do Museu de Zoologia da USP; Catálogo eletrônico da Coleção de Lepidoptera do Museu da Universidade Federal do Paraná disponível em <http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=DZUP-Lepidoptera&setlang=pt>).

Estudos filogeográficos de espécies endêmicas da Mata Atlântica têm servido para compor trabalhos mais amplos sobre a evolução biogeográfica do bioma como um todo (Carnaval & Moritz, 2008). Carnaval & Moritz (2008) compararam seus dados paleoclimáticos com um conjunto de dados filogeográficos sobre vertebrados levantados da literatura e definiram dois principais refúgios ao norte do rio Doce, onde a Mata Atlântica se manteve presente mesmo durante as mudanças climáticas do Pleistoceno. Uma dessas áreas encontra-se na Bahia, enquanto a outra, em Pernambuco. Dada a escassez de trabalhos filogeográficos avaliando táxons ao sul do rio Doce (Carnaval & Moritz 2008), pouco se sabe atualmente sobre a distribuição geográfica passada dos táxons endêmicos, e, portanto, sobre os refúgios pleistocênicos, dessa importante fração do bioma da Mata Atlântica. Amorim & Oliveira (2008), estudando grupos de espécies de *Cluzobra* Edwards, 1940 (Diptera: Mycetophilidae), encontraram padrões muito semelhantes para os refúgios no nordeste brasileiro. Grupos de espécies desse gênero apresentaram distribuição ou ao norte ou ao sul do rio Doce. Por ter sido o Espírito Santo uma das áreas com baixa representatividade nos seus dados, Amorim & Oliveira (2008) trataram todo o estado como um possível limite de distribuição, ou um refúgio independente, dando menor atenção à barreira formada pelo rio. A partir de seus resultados, os autores estimaram uma área de endemismo compartilhada entre os Estados ao sul do Brasil, a província de Misiones, na Argentina, e o Paraguai, mas com limites incertos. A Mata Atlântica apresenta elevado grau de endemismo evidenciado por estudos com plantas e vertebrados, porém ainda pouco analisado com invertebrados (Pinto-Da-Rocha & Da Silva, 2005). Em Eupnoi, uma subordem de Opiliones, o nível de endemismo chega a 97,5% (Tourinho-Davis & Kury, 2003, Tourinho-Davis, 2004).

No Brasil, ao menos parte das populações da maioria das espécies de Ambulycini pode ser encontrada em fragmentos de Mata Atlântica, especialmente nas formações submontana e montana das fitofisionomias de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa (M. Duarte, dados não publicados sobre registros e prováveis ocorrências de Sphingidae em território brasileiro). *Adhemarius eurysthenes* (Felder, [1874]) e *Orecta lycidas lycidas* (Boisduval, [1875]) aparentemente são táxons endêmicos da porção sul desta formação. Essas duas espécies distribuem-se do norte do Estado do Espírito Santo ao norte do Rio Grande do Sul no território brasileiro (Rothschild & Jordan, 1903; Oliveira *et al.*, 1999; além de dados disponíveis no sítio <http://www.pybio.org>). Não obstante haja ainda um registro de *O. l. lycidas* para a cidade de Pelotas, região sudeste do Rio Grande do Sul, na coleção do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

1.2. O papel dos genes

Marcadores moleculares são amplamente utilizados para estimar características populacionais e demográficas tais como migração, conectividade e fluxo gênico, além de ajudarem na identificação dos padrões que organizam a biodiversidade (Freeland, 2006; Johnson *et al.*, 2009). Marcadores dessa natureza permitem o estudo da distribuição da variabilidade genotípica entre populações (Bereczki *et al.*, 2005; Pecsénye *et al.*, 2007). Adicionalmente, a genética de populações, combinada à filogenia de genes, permite a investigação de táxons e grupo de táxons intimamente relacionados, contribuindo para o conhecimento dos mecanismos atuantes de especiação (Vogler & Monaghan, 2006). Análises filogeográficas, por sua vez, podem elucidar questões sobre a distribuição geográfica das linhagens evolutivas, dando pistas sobre os padrões históricos de dispersão, adaptação local e especiação (Avice, 2000). A filogeografia permite identificar unidades evolucionárias significativas (ESU, da sigla em inglês) – populações geneticamente muito distintas – e, assim, auxilia na indicação de áreas prioritárias para a conservação (Batalha-Filho & Miyaki, 2011). A disposição geográfica de linhagens genéticas e a distribuição da variabilidade a elas associada permitem incluir o tempo e o espaço nas análises de populações (Freeland, 2006).

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta características que o distinguem como uma ferramenta particularmente útil para estudos filogeográficos e filogenéticos em níveis taxonômicos mais baixos. Por sua fácil amplificação e sequenciamento, alta

taxa de mutações, arranjo conservado dos genes, herança quase exclusivamente materna, com raros casos de heteroplasmia e herança paterna, e baixa frequência de recombinação, o mtDNA permite identificar linhagens genéticas de modo mais eficiente que o DNA nuclear (nDNA) (Avise, 2000). Há, entretanto, alguns riscos associados ao uso do mtDNA para estudos populacionais. A existência de pseudogenes mitocondriais – cópias do mtDNA que foram translocadas para o genoma nuclear – são particularmente importantes, pois essas cópias evoluem independentemente e podem ser amplificadas junto com ou em lugar da região mitocondrial desejada, mascarando sinais filogenéticos (Freeland, 2006). O estudo de marcadores de ambas as origens (nuclear e citoplasmática) pode ajudar na identificação destas situações, assim como permite a identificação do desequilíbrio citonuclear, que consiste na hibridização do mtDNA com o nDNA de espécies ou populações diferentes (Avise, 2001; Won *et al.*, 2003). Além disso, diferenças entre a variabilidade genética encontrada no mtDNA e no nDNA em uma população podem indicar grandes contrastes de vagilidade entre machos e fêmeas para as espécies cuja herança do mtDNA é uni-parental (Freeland, 2006).

A filogeografia multilocos é a proposta de inclusão de marcadores nucleares para diminuir a estocasticidade das genealogias gênicas (Batalha-Filho & Miyaki, 2011). Entretanto, marcadores nucleares apresentam problemas como altas taxas de recombinação, ocasionando a mistura de haplótipos, genes parálogos (cópias dos genes que podem estar desligados ou servir para funções diferentes da função original), taxa de mutação demasiadamente baixa e triagem incompleta de linhagens (Batalha-Filho & Miyaki, 2011). Não obstante, a compilação dos dados obtidos de vários marcadores pode fornecer pistas sobre a história evolutiva das espécies estudadas (Hare, 2001; Brito & Edwards, 2009; McCormack *et al.*, 2009).

Adhemarius eurysthenes pode ser abundantemente coletada ao longo do ano na Estação Biológica da Boraceia (Duarte *et al.*, 2008) e em outras localidades com levantamentos de Sphingidae (F. Amorim, comunicação pessoal), o que permite amostragens significativas de suas populações para estudos filogeográficos. Análises populacionais desta espécie podem indicar padrões de distribuição comuns a *O. lycidas lycidas*, posto que ambas têm distribuição geográfica muito semelhante. Além disso, tratando-se de gêneros da mesma tribo, cujas larvas se alimentam de Lauraceae

(Oehlke, 2000; Zikán, 1928), provavelmente *A. eurysthenes* e *O. lycidas* apresentam um padrão de estruturação genética parecido. Com base nessas premissas, levantar dados sobre a estrutura e a variabilidade genética de táxons próximos a partir de diferentes populações, permitirá que ações futuras para a conservação de *O. lycidas*, ou de outras linhagens de Ambulycini endêmicas da Mata Atlântica, possam levar em conta como a diversidade genética está estruturada no espaço e no tempo. Ainda, um entendimento apurado sobre o relacionamento histórico de *A. eurysthenes* com a região da Mata Atlântica em que ela ocorre pode vir a compor trabalhos futuros que tratem da conservação deste bioma tão fortemente ameaçado.

1.3. Objetivo

Analisar a estrutura e a variabilidade genética de populações de *Adhemarius eurysthenes* em território brasileiro e, de posse desses dados, subsidiar ideias que possam contribuir para a conservação de *Orecta lycidas* e espécies raras de Ambulycini (Sphingidae, Smerinthinae), como a determinação de áreas com prioridade de preservação.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do material

Adhemarius eurysthenes foi coletada em cinco estados brasileiros, o que permitiu a amostragem de quase toda a distribuição geográfica conhecida para a espécie, com exceção da porção norte do Rio Grande do Sul, cujos registros restringem-se às proximidades da divisa com o Estado de Santa Catarina (A. Moser, comunicação pessoal), e leste do Paraguai (Diaz, 2014) (Tabela 2.1). As amostragens foram realizadas por meio de armadilhas luminosas compostas por lâmpada mista (com vapor de mercúrio) de 500 W, disposta diante de um anteparo branco (lençol ou parede). Procurou-se, sempre que possível, executar as campanhas durante o período de lua nova, pois as noites mais escuras permitem um maior destaque das armadilhas. Os exemplares coletados tiveram as pernas meso- e metatorácicas destacadas e foram sacrificados com uma injeção de amônia 10% na região do tórax. As amostras foram etiquetadas para a devida identificação posterior e o material testemunho está depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. As viagens foram

realizadas preferencialmente em meses mais quentes e chuvosos de agosto de 2012 a abril de 2014.

As populações foram identificadas com os códigos que se encontram na Tabela 2.1.

2.2. Dados moleculares

Foram estudados três fragmentos de genes, dois do DNA nuclear (a região terminal da carbamoil-fosfato sintase – CAD, ca. de 850 pb – e *wingless*, ca. de 400 pb) e um do DNA mitocondrial (extremidade 5' da subunidade I da enzima Citocromo c Oxidase – COI, ca. de 658 pb). O DNA genômico total foi extraído das pernas, seguindo-se o protocolo do Kit DNeasy Blood and Tissue da Qiagen (QIAGEN Redwood City, CA, EUA). Os apêndices destacados dos exemplares durante a coleta foram acondicionados em frascos contendo álcool etílico absoluto 99,8% P.A Impex, posteriormente armazenados em freezer a - 20 °C. Após a extração do DNA genômico, foram amplificados a extremidade 5' do gene COI e fragmentos dos genes nucleares CAD e *wingless* (ver Tabela 2.2 com os oligonucleotídeos inicializadores utilizados).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com o volume total de 22 µl de solução contendo 1,5 µl de DNA molde, 14,3 µl de H₂O milli-Q, 2,5 µl de 10X buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1% Triton X-100, pH 8.3), 0,5 µl de dNTPs a 10 mM, 1 µl de cada inicializador a 10 mM, 2 µl de MgCl₂ a 25 mM, 0,2 µl de GoTaq® Taq DNA-polimerase (Promega Corporation, EUA). Os programas utilizados na amplificação foram padronizados tendo como base os protocolos descritos em Silva-Brandão *et al.* (2005) para o gene COI e Wahlberg & Wheat (2008) para os fragmentos de CAD e *wingless* (ver Tabela 2.3).

Os produtos das reações de amplificação foram purificados através do protocolo ExoSAP-IT (GE Healthcare, Bucks, UK), e sequenciados seguindo-se o protocolo do kit Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems Inc., USA) em um Sequenciador Automático 3500XL DNA ABI PRISM (Applied Biosystems Inc., EUA), utilizando-se os inicializadores senso e/ou anti-senso usados na amplificação. A maioria das amostras foi sequenciada utilizando apenas a cadeia senso. Entretanto, pela dificuldade de se obter as sequências do fragmento do gene CAD, bem como de algumas das sequências para os outros marcadores, em alguns casos foram sequenciadas a cadeia senso e a anti-senso. A qualidade das sequências foi avaliada com o programa Finch-TV 1.4.0 (Geospiza Inc., EUA) e as sequências foram alinhadas

a olho com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Foi utilizada a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) através do sítio do Genbank para realizar os primeiros alinhamentos das sequências obtidas.

2.3. Análises filogeográficas

Para verificar a estruturação genética de grupos de indivíduos que se diversificaram recentemente, usa-se sequências com evolução rápida, cujo acúmulo de mutações permite a separação de linhagens. Desse modo, maior ênfase foi dada às informações extraídas do fragmento COI.

Matrizes de caracteres moleculares foram organizadas usando o software MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). Caracteres faltantes nas sequências foram codificados como '?' e sítios ambíguos como 'N'. Foi determinado o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explica as variações de cada marcador. As distâncias genéticas entre todos os indivíduos coletados e as distâncias médias dentro e entre as localidades foram calculadas usando-se os modelos de substituição de nucleotídeos obtidos para cada marcador (Nei & Kumar, 2000). Uma árvore de Máxima Verossimilhança (ML) foi recuperada para a região do gene COI e a consistência dos ramos foi estimada pelo procedimento de bootstrap não-paramétrico com 1000 repetições (Felsenstein, 1985), usando-se o mesmo programa.

Uma rede com o menor número de passos para estimar o relacionamento entre os haplótipos (Templeton *et al.*, 1992) foi elaborada no programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) a partir das sequências de COI para as populações de *A. eurysthenes*. O número de haplótipos para cada população foi calculado no mesmo programa. O relacionamento entre cada par de haplótipos foi restringido pela probabilidade de parcimônia para as diferenças menores que 0,95 do DNA entre os pares. A inferência e correlação de um haplótipo ancestral com a sua localização geográfica pode ser usada para inferir possíveis formas de dispersão da espécie no passado.

A estrutura genética entre e dentro de cada localidade amostrada foi avaliada por uma análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) executada no programa Arlequin versão 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010). Nas comparações entre as populações foi permitido um nível de dados faltantes de 5%. Assim, foi calculada a distribuição da variância molecular atribuída à presença de estrutura

genética entre os indivíduos de todas as localidades amostradas (teste não-hierárquico). O grau de estruturação foi interpretado pela estatística Φ . A significância dos valores de Φ_{ST} foi verificada através de 10000 permutações, com a matriz de distância preenchida usando as diferenças par-a-par e o valor de gamma a igual a zero. Adicionalmente, foi aplicada uma Análise Especial de Variância Molecular (SAMOVA) (Dupanloup *et al.*, 2002) para identificar a maior diferenciação genética entre as amostras, usando o programa SAMOVA versão 1.0 (disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/samova/>). Esta análise avalia todas as possíveis configurações de grupos de populações que maximizam o componente ‘entre-grupos’ do total da variação genética e reduz o componente ‘entre populações internas aos grupos’ e foi aplicado para definir grupos de populações que possam ser considerados geograficamente homogêneos e explicitamente diferentes de outros grupos. A significância do F_{ST} (divergência da frequência alélica global entre populações), F_{SC} (divergência entre populações dentro de grupos) e F_{CT} (divergência entre grupos) foram computadas através do procedimento de permutação não-paramétrica com 10000 interações.

Uma matriz de distâncias linearizadas de F_{ST} par-a-par de Slatkin foi estimada com o programa Arlequin versão 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010). Para avaliar se o fluxo gênico está correlacionado com a distância geográfica, testou-se a correlação entre as distâncias linearizadas de F_{ST} par-a-par com a matriz das distâncias geográficas lineares. O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi usado para testar a hipótese de isolamento genético pela distância geográfica com 10000 permutações.

3. Resultados

Foram coletados 109 indivíduos de 10 localidades em 14 campanhas (Tabela 2.1).

O estudo da sequência barcode (658 pb) de *A. eurysthenes* de 10 localidades distintas resultou em 14 haplótipos, dos quais oito são haplótipos representados por um único indivíduo. A rede de haplótipos obtida está representada na Figura 2.1. Foram realizadas duas campanhas à Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (PASP) que resultaram na coleta de apenas um indivíduo. Pela baixa amostragem desta localidade e pela sua proximidade genética e geográfica com a população coletada na Estação Biológica da Boraceia (BOSP), optou-se por agrupá-las em uma única população. H1 foi o haplótipo mais frequente, representado por 60 indivíduos. Este

haplótipo corresponde a pelo menos 50% de sete das oito populações e está ausente na população do Espírito Santo (ARES). O segundo haplótipo mais frequente (H2), representado por 19 indivíduos, pode ser encontrado, em frequência menor do que 25%, em ARES (Augusto Ruschi – ES), SVSP (Santa Virgínia – SP), BOSP+PASP, JASP (Serra do Japi – SP) e PMPR (Pico Marumbi – PR) e está ausente em RTSP (Rio Turvo – SP) e SISC (Serra do Itajaí – SC). FCRJ+SORJ (Fazenda Campestre e Serra do Órgãos, respectivamente – RJ) é representada por apenas dois haplótipos, sendo que H2 corresponde a aproximadamente 47% dos indivíduos amostrados. Quatro haplótipos compõem a população ARES, porém apenas o haplótipo H2 é compartilhado com outras populações. Os haplótipos H4, H5 e H6, exclusivos de ARES, têm frequências de 7, 4 e 2 indivíduos, respectivamente.

A maior diversidade genética foi obtida para a população do Estado do Espírito Santo (ARES). A maior homogeneidade genética, por sua vez, foi encontrada nas populações da Serra do Japi (JASP) e da Fazenda Campestre (FCRJ). Na Estação Biológica de Boraceia (BOSP), apenas a amostra BOSP7 apresentou o número de substituições de nucleotídeo por sítio igual a 0,002 em relação aos demais indivíduos da população e também em relação à amostra de Paranapiacaba (PASP1). A distância genética média entre ARES e cada uma das demais populações se manteve constante, por volta de 0,006. A segunda população geneticamente mais distante foi a população RTSP, com distância média igual a 0,002 em relação à SVSP e 0,001 em relação às demais, seguida por SISC com o valor médio sempre igual a 0,001. JASP, BOSP+PASP, SVSP e FCRJ+SORJ apresentaram valor nulo de distância genética entre si, mostrando grande similaridade entre estas populações.

Figura 2.1. Mapa da distribuição dos haplótipos nas populações amostradas. À direita, rede de haplótipos estimada a partir das sequências de COI das populações de *Adhemarius eurysthenes*. No mapa, os gráficos indicam as frequências relativas dos haplótipos encontrados em cada população; as cores correspondem àquelas indicadas na rede. Na rede, o tamanho dos círculos corresponde à frequência dos haplótipos, círculos menores representam os haplótipos únicos e, cada pequeno círculo branco, a mudança de uma base nitrogenada.

Figura 2.2. Distâncias genéticas dentro das populações de *A. eurysthene*, calculadas com o modelo T92. Em preto o segundo quartil e em cinza o terceiro quartil das distâncias. Barras verticais estreitas indicam o maior valor encontrado. A análise envolveu 109 sequências. As posições dos códons incluídas foram 1^a+2^a+3^a+não-codificante. Foram eliminadas todas as posições contendo dados faltantes, restando 607 posições no conjunto de dados final. Código das populações conforme Tabela 2.1.

Figura 2.3. Distância genética média dentro das populações de *A. eurysthene* para cada um dos marcadores. Todas as análises foram feitas com as posições 1^a+2^a+3^a+não-codificante de 109 sequências. Para COI, as análises seguiram a configuração descrita na Figura 2.2, e para CAD e *wingless*, foram removidas par-a-par todas as posições contendo *gaps* e dados faltantes. Código das populações conforme Tabela 2.1.

3.1. Estruturação genética das populações de *Adhemarius eurysthene*s

O índice de fixação (F_{ST}), que mede o quanto cada subpopulação (tratadas aqui como populações) se diferencia geneticamente da população total (subpopulações combinadas), foi 0,259 ($p = 0 \pm 0$). São considerados indicativos de alta diferenciação genética os valores acima de 0,25 (Freeland, 2006). Entretanto, mesmo valores muito menores podem indicar um grau de estruturação relevante. Para medir a significância dos valores obtidos é então avaliado, por milhares de permutações aleatórias dos haplótipos nas populações e cálculo dos novos índices F_{ST} correspondentes, o número de vezes em que os valores foram iguais ou superiores aos valores de F_{ST} iniciais (valor-p). Na comparação dos F_{ST} par-a-par, a maior diferença foi -0,2 entre PASP (representada por apenas um indivíduo) e FCRJ. Essa diferença, no entanto, certamente advém da pequena representatividade de PASP. Os valores-p relativos aos F_{ST} par-a-par indicam significância para todas as comparações de ARES, menos para aquela entre ARES e PASP, ao passo que todas as comparações de PASP foram não-significantes. Também apresentaram valores-p $> 0,05$ (nível de significância) todas as comparações de SORJ e SVSP, exceto entre estas populações e ARES.

O Teste de Mantel, que avalia a correlação entre os dados da matriz linearizada de F_{ST} de Slatkin e uma matriz das distâncias geográficas lineares, mostrou um baixo coeficiente de correlação ($r = -0,098$), com um valor de determinação da matriz de F_{ST} pelas distâncias geográficas correspondentes abaixo de 0,01% ($p = 0,67$). A Análise Espacial de Variação Molecular (SAMOVA), por outro lado, obteve dois grupos estruturados geograficamente com um alto valor de divergência entre eles ($F_{CT} = 0,525$). A divisão das populações em dois grupos resultou na separação de ARES de todas as demais populações, sendo que a diferenciação genética média dentro de cada grupo (F_{SC}) é 0,023. Já a divergência global entre as populações de cada grupo é indicada por um elevado valor de F_{ST} (0,536). Pelos testes de significância, o valor-p para F_{SC} foi igual $0,00079 \pm 0,00027$, enquanto que para F_{CT} foi $0,10000 \pm 0,00306$, indicando baixa significância do segundo valor. F_{ST} apresentou significância igual a 0 ± 0 .

3.2. Contribuições do DNA nuclear

Os dois marcadores nucleares apresentaram baixa divergência genética dentro das populações (Figura 2.3). A maior discrepância para o gene *wingless* foi encontrada

em RTSP, com distância genética média igual a aproximadamente 0,0014 dentro da população. Esta também foi a população com maior distância genética média para o gene CAD, seguida de perto por SISC com valores extremamente baixos (0,000487 e 0,000481, respectivamente). Para as comparações envolvendo o gene CAD existe a ressalva de que seu conjunto de dados é menor do que aquele dos demais marcadores, ou seja, apenas uma parcela de cada população foi sequenciada para este gene, devido a problemas com a sua amplificação (ver Tabela.2.7, com os indivíduos sequenciados para cada marcador). Somente uma mutação não sinônima foi encontrada para CAD e nenhuma para *wingless*. A presença de uma mutação não-sinônima no gene CAD, resultante da variação na segunda posição de um códon GTG, está difundida nas populações de *A. eurysthenes* amostradas e os dois alelos possíveis foram registrados em todas as populações. O número de sítios variáveis nas regiões nucleares foi cerca de nove vezes menor do que aquele para o gene COI (Tabela 2.5).

4. Discussão

Estudos de genética de populações com lepidópteros brasileiros têm tido maior foco sobre espécies-pragas (Diez-Rodrigues & Omoto, 2001). Sendo assim, pouco se tem produzido nessa área com espécies silvestres e a filogeografia de uma espécie de Sphingidae em território brasileiro é inédita, carecendo de dados para comparações. Não obstante, estudos com outros insetos voadores têm apresentado resultados semelhantes, como uma fraca determinação das diferenças genéticas pelas distâncias geográficas (Kraushaar *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2013).

A comparação com espécies-pragas apresenta limitações óbvias. Insetos que atacam plantações têm distribuição espacial grandemente influenciada pelo homem, sendo frequentemente introduzidas por cultivos em novas regiões (Kirk *et al.*, 2013). Por outro lado, o uso de pesticidas pode agir como gargalo sobre a variação genética (Puillandre *et al.*, 2008). Dessa forma, a distribuição geográfica de haplótipos em lepidópteros silvestres está mais relacionada aos fatores ambientais envolvidos na estruturação genética do que aquela nas populações de pragas.

4.1. A importância da população do Espírito Santo

O haplótipo mais comum (H1) está presente em quase todas as populações com frequência igual ou superior a 50%, mesmo naquelas menos amostradas, com apenas

sete indivíduos (SVSP e RTSP). A ausência de H1 em ARES (Tabela 2.4), a despeito da possibilidade de não ter sido amostrada toda a diversidade genética nesta população, mostra o grau de isolamento genético em que ela se encontra. Por outro lado, a composição por quatro haplótipos, sendo três deles haplótipos únicos, é outro forte indicativo de pouco fluxo gênico entre ARES e outras populações. Levando-se em consideração que as maiores diversidades genéticas (representadas aqui pelo número de haplótipos) usualmente ocorrem nos limites de distribuição geográfica de uma espécie (Puillandre *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012), além da ausência de registros de *A. eurysthens* para localidades baianas (V. Becker, comunicação pessoal), pode-se supor que a população ARES é ou está muito próxima do limite norte de distribuição da espécie.

ARES foi a única população considerada pela Análise Espacial de Variação Molecular (SAMOVA) como geograficamente isolada por uma estruturação genética particular. Embora esta tenha sido também a população mais afastada geograficamente, distando cerca de 350 km do ponto de coleta mais próximo (100 km a mais do que o segundo par mais distante), não foi identificada uma determinação significativa das diferenças genéticas pelas distâncias geográficas no conjunto de dados total.

Em concordância com resultados obtidos para outras espécies animais (Carnaval & Moritz, 2008), a fronteira da distribuição geográfica de *A. eurysthens* parece ser o rio Doce. Pelo mapa da Figura 2.1, se considerado o rio Doce como limite da distribuição, o Rio de Janeiro é a única região que pode fornecer migrantes de *A. eurysthens* para ARES. Dessa forma, a conexão entre ARES e FCRJ+SORJ é representada pelo compartilhamento do haplótipo H2. Carnaval & Moritz (2008), através de modelos paleoclimáticos, inferiram que apenas pequenos refúgios devem ter existido ao sul do rio Doce durante as mudanças climáticas do Pleistoceno. Como descrevem, esses resultados não contradizem as amplas áreas de endemismo previstas por Tyler *et al.* (1994) para borboletas, uma vez que estas áreas englobam os pequenos refúgios encontrados por seus modelos. Estudos filogeográficos com mamíferos, no entanto, ao conflitarem com suas predições, são tentativamente explicados por duas hipóteses: configurações equivocadas nos programas utilizados podem ter ignorado regiões de maior complexidade topográfica; ou fragmentos florestais persistiram em regiões atualmente ocupadas pelo Oceano Atlântico durante as tribulações climáticas do Pleistoceno, que não foram incluídas nas suas análises. Sendo assim, é possível que

a diversidade molecular encontrada para *A. eurysthenes* próximo ao rio Doce, reflita padrões biogeográficos de distribuição da Mata Atlântica durante períodos de regressão deste bioma. Para tanto, considerando que amostras dessa espécie são mais frequentemente coletadas entre altitudes acima de 800 metros (observação pessoal), a hipótese levantada é de que a população ARES advém de um possível refúgio de Mata Atlântica em regiões de grande altitude. Deve-se destacar, porém, que os dados obtidos neste trabalho não são conclusivos neste aspecto, e estudos mais específicos, com os testes apropriados, ainda são necessários.

4.2. Populações de origem

Além de ARES, diversidades iguais ou superiores a quatro haplótipos foram encontradas também em RTSP, PMPR e SISC, todas próximas ao limite sul dessa distribuição (RTSP possui quatro haplótipos mesmo sendo representada por apenas sete indivíduos). Estas populações ainda apresentam grande proporção de H1 indicando sua conectividade com as demais populações. Por outro lado, é notável que o haplótipo H2, segundo em termos de frequência, presente inclusive em ARES, não tenha sido encontrado em RTSP e SISC. Em RTSP, também foi verificado um elevado valor de distância genética para o gene COI. Novamente, o resultado obtido é bastante curioso, pois indica grande diversidade genética mesmo em uma pequena amostragem, apesar da localização mais central desta população na distribuição geográfica total da espécie. Já na análise de cada um dos três marcadores, RTSP foi sempre uma das populações com maior distância genética média interna, quando não a maior (no caso de *wingless* e CAD). Os dados assim convergem para indicar a grande importância desta população na manutenção da diversidade genética de *A. eurysthenes*, ao lado de ARES.

Supondo-se que as populações com alta diversidade e endemismo sejam representantes de populações que foram centros de dispersão no passado, teríamos então que ao menos três localidades originaram a distribuição geográfica atual de *A. eurysthenes*: uma em ARES, uma em RTSP e outra em PMPR ou SISC, ou talvez, em ambas.

A reduzida variabilidade nos marcadores nucleares, que pouco contribuíram para estudar a estruturação genética da espécie ao longo de sua distribuição geográfica, não confirmam a validade da extrapolação dos resultados obtidos para a história evolutiva da espécie como um todo. Assim, os resultados podem traduzir apenas a história evolutiva do marcador COI em *A. eurysthenes*, ou, se mais abrangentes, a

história evolutiva das fêmeas dessa espécie. As diferenças de vagilidade entre os sexos podem ser significativas em escala local. A presença de uma probóscide bem desenvolvida em ambos os sexos de *A. eurysthenes*, o que remete à visita frequente de flores pelos adultos, como já observado em *Protambulyx strigilis* (Tuttle *et al.*, 2007), sugere uma vagilidade similar (ver Janzen, 1984, sobre vagilidade dos Sphingidae da Costa Rica). No entanto, estudos de levantamento de Sphingidae recentes para Estação Biológica de Boraceia, São Paulo, demonstram que os machos de *A. eurysthenes* chegam a ser cerca de 11 vezes mais frequentes do que as fêmeas nas armadilhas luminosas (P. I. Chiquetto-Machado, com. pess.), indicando diferenças significativas de vagilidade entre os sexos.

4.3. *Adhemarius eurysthenes*: um indicador biológico para a conservação dos Ambulycini neotropicais?

Extrapolações dos padrões de estruturação genética de *A. eurysthenes* são possíveis desde que características determinantes da distribuição geográfica sejam compartilhadas. Assim, por exemplo, o fato de ser uma espécie noturna, cujas larvas se alimentam de Lauraceae, deve ter correspondência nos outros táxons. Posto que a relação da maioria dos lepidópteros especialistas com suas plantas hospedeiras é de particular importância na distribuição geográfica das espécies (Wahlberg *et al.*, 2013), ao menos os hábitos alimentares das larvas devem ser levados em consideração.

O uso de plantas hospedeiras da família Lauraceae é o mais difundido entre as larvas dos Ambulycini neotropicais (ver seção 4.4 do Capítulo 1). A partir dessa informação, estima-se que espécies filogeneticamente próximas, que se alimentam das mesmas hospedeiras, podem ter respondido de forma semelhante às variações ambientais no passado, apresentando um padrão de distribuição geográfica parecido. Apesar da grande diversidade encontrada em Lauraceae, uma das maiores famílias de Angiospermae, *Orecta lycidas* e *A. eurysthenes* são espécies com grande potencial de compartilharem a mesma planta hospedeira em ambiente natural. Na literatura, dados de criação relacionam os hábitos alimentares das larvas de *O. lycidas* a espécies dos gêneros *Ocotea* e *Nectandra* (Zikán, 1928; Oehlke, 2000), mas, para *A. eurysthenes*, a relação com *Ocotea* e *Persea* é ainda uma suposição (Oehlke, 2000). Embora a transposição dos resultados obtidos para *O. lycidas* precise ser melhor fundamentada por estudos comparativos mais amplos, acredita-se que *A. eurysthenes* se apresenta como um bom modelo para inferir áreas prioritárias para o manejo da diversidade

genética, seja de *O. lycidas* ou de outros Ambulycini neotropicais. Nesses termos, recomenda-se estender o estudo filogeográfico de *A. eurysthenes* para uma amostragem mais completa da espécie, possibilitando um entendimento ainda melhor sobre a sua relação com a Mata Atlântica.

5. Conclusão

Organismos voadores são presumidamente bons dispersores. Entretanto, as habilidades de dispersão podem ser bastante restritas, dependendo de fatores biológicos específicos para cada espécie, mesmo em mariposas de voo potente como as da família Sphingidae. Em *A. eurysthenes*, cerca de 350 km são o suficiente para manter a população ARES relativamente isolada. Não obstante, estudos futuros com novos marcadores moleculares e com maior amostragem das populações, bem como com a inclusão de amostras de outras regiões da distribuição geográfica, são importantes para confirmar os dados obtidos e testar se eles refletem a história evolutiva de ambos os sexos ou apenas das fêmeas.

Sabendo-se da importância das populações do Espírito Santo na manutenção da diversidade genética de *A. eurysthenes*, e seu possível papel na descrição dos padrões biogeográficos do rico e ameaçado bioma da Mata Atlântica, encoraja-se a conservação dos remanecentes atuais desta floresta, com o objetivo de manter a conectividade entre as populações para que estudos futuros ampliem as conclusões aqui obtidas. Além disso, de posse dos resultados presentes e futuros, acredita-se que será possível estimar os padrões de estruturação genética de outras espécies neotropicais de Ambulycini, especialmente aquelas que apresentam hábitos similares e proximidade filogenética, como é o caso de *Orecta lycidas*.

Anexos

Tabela 2.1. Quantidade de indivíduos de *Adhemarius eurysthenes* coletados por localidade amostrada.

Estado	Reserva/Localidade	Nº de indivíduos
Espírito Santo	- Reserva Biológica Augusto Ruschi (ARES)	16
Rio de Janeiro	- Parque Nacional da Serra dos Órgãos (SORJ)	4
	- Fazenda Campestre (FCRJ)	11
São Paulo	- Estação Biológica da Boraceia (BOSP)	20
	- Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi (JASP)	17
	- Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (PASP)	1
	- Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Santa Virgínia) (SVSP)	7
	- Parque Estadual do Rio Turvo (RTSP)	7
Paraná	- Parque Estadual do Pico Marumbi (PMPR)	18
Santa Catarina	- Parque Nacional da Serra do Itajaí (SISC)	8

Tabela 2.2. Inicializadores utilizados para a amplificação dos fragmentos propostos

Gene	Direção	Nome do inicializador	Inicializador	Tamanho (bp)	Referência
COI	Forward	LCO	5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	658	(Folmer <i>et al.</i> , 1994)
	Reverse	HCO	5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		
<i>wingless</i>	Forward	LepWg1	5' GAR TGY AAR TGY CAY GGY ATG TCT GG 3'	400	(Brower & DeSalle, 1998)
	Reverse	LepWg2	5' ACT ICG CAR CAC CAR TGG AAT GTR CA 3'		
CAD	Forward	CAD743f	5' GGN GTN ACN ACN GCN TGY TTY GAR CC 3'	850	(Wahlberg & Wheat, 2008)
	Reverse	CAD1028r	5' TTR TTN GGN ARY TGN CCN CCC AT 3'		

Tabela 2.3. Programas utilizados na amplificação dos marcadores moleculares.

	COI		<i>wingless</i>		CAD	
1º passo	1x	94 °C, 2 min	1 x	95 °C, 7 min	1x	95 °C, 5 min
2º passo		94 °C, 1 min		95 °C, 1 min		94 °C, 1 min
3º passo	35x	45 °C, 1 min	35x	50 °C, 1 min	40x	54 °C, 1 min
4º passo		72 °C, 1,5 min		72 °C, 2 min		72 °C, 1,5 min
5º passo	1x	72 °C, 5 min	1 x	72 °C, 10 min	1x	72 °C, 10 min

Tabela 2.4. Distribuição dos haplótipos nas populações de *A. eurysthenes* estudadas (códigos das populações conforme Tabela 2.1).

Haplótipos	Populações							
	ARES	FCRJ+ SORJ	SVSP	BOSP+ PASP	JASP	RTSP	PMPR	SISC
H1	0	8	5	16	14	4	9	4
H2	3	7	1	4	3	0	1	0
H3	0	0	1	0	0	0	6	2
H4	7	0	0	0	0	0	0	0
H5	4	0	0	0	0	0	0	0
H6	2	0	0	0	0	0	0	0
H7	0	0	0	0	0	0	0	1
H8	0	0	0	0	0	1	0	0
H9	0	0	0	1	0	0	0	0
H10	0	0	0	0	0	0	0	1
H11	0	0	0	0	0	1	0	0
H12	0	0	0	0	0	0	1	0
H13	0	0	0	0	0	0	1	0
H14	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabela 2.5. Sítios variáveis e mutações não-sinônimas de cada marcador.

Marcador	Nº de sítios variáveis/total de sítios	Nº de mutações não-sinônimas
COI	18/658	1
CAD	2/859	1
<i>wingless</i>	2/412	0

Tabela 2.6. Número de identificação dos vouchers de *Adhemarius eurysthene*s analisados (códigos conforme Tabela 2.1).

Código	Data de coleta	Voucher
ARES 1	xi.2012	MOL 145
ARES 2	xi.2012	MOL 146
ARES 3	xi.2012	MOL 147
ARES 4	xi.2012	MOL 148
ARES 5	xi.2012	MOL 149
ARES 6	xi.2012	MOL 150
ARES 7	xi.2012	MOL 152
ARES 8	xi.2012	MOL 153
ARES 9	xi.2012	MOL 154
ARES 10	xi.2012	MOL 155
ARES 11	xi.2012	MOL 157
ARES 12	xi.2012	MOL 158
ARES 13	xi.2012	MOL 159
ARES 14	xi.2012	MOL 160
ARES 15	xi.2012	MOL 161
ARES 16	xi.2012	MOL 162
FCRJ 1	i.2014	MOL 163
FCRJ 2	i.2014	MOL 164
FCRJ 3	i.2014	MOL 165
FCRJ 4	i.2014	MOL 166
FCRJ 5	i.2014	MOL 167
FCRJ 6	i.2014	MOL 168
FCRJ 7	i.2014	MOL 169
FCRJ 8	i.2014	MOL 170
FCRJ 9	i.2014	MOL 171
FCRJ 10	i.2014	MOL 172
FCRJ 11	i.2014	MOL 173
SORJ 1	ii.2013	MOL 44
SORJ 2	ii.2013	MOL 45
SORJ 3	ii.2013	MOL 46
SORJ 4	ii.2013	MOL 47
SVSP 1	iv.2014	MOL 272
SVSP 2	iv.2014	MOL 274
SVSP 3	iv.2014	MOL 275
SVSP 4	iv.2014	MOL 276
SVSP 5	iv.2014	MOL 277
SVSP 6	iv.2014	MOL 278
SVSP 7	iv.2014	MOL 279
BOSP 1	viii.2012	MOL 107
BOSP 2	viii.2012	MOL 108
BOSP 3	viii.2012	MOL 109
BOSP 4	viii.2012	MOL 110
BOSP 5	viii.2012	MOL 111
BOSP 6	viii.2012	MOL 112
BOSP 7	viii.2012	MOL 113
BOSP 8	viii.2012	MOL 114
BOSP 9	viii.2012	MOL 115
BOSP 10	viii.2012	MOL 116
BOSP 11	viii.2012	MOL 117
BOSP 12	viii.2012	MOL 118
BOSP 13	viii.2012	MOL 119

Tabela 2.6. Número de identificação dos vouchers de *Adhemarius eurysthene*s analisados (códigos conforme Tabela 2.1).

Código	Data de coleta	Voucher
BOSP 14	viii.2012	MOL 120
BOSP 15	viii.2012	MOL 121
BOSP 16	viii.2012	MOL 122
BOSP 17	viii.2012	MOL 123
BOSP 18	viii.2012	MOL 124
BOSP 19	viii.2012	MOL 125
BOSP 20	viii.2012	MOL 126
PASP 1	xii.2013	MOL 95
JASP 1	viii-ix.2012	MOL 27
JASP 2	viii-ix.2012	MOL 29
JASP 3	viii-ix.2012	MOL 30
JASP 4	viii-ix.2012	MOL 31
JASP 5	viii-ix.2012	MOL 37
JASP 6	iii.2013	MOL 59
JASP 7	iii.2013	MOL 60
JASP 8	iii.2013	MOL 61
JASP 9	iii.2013	MOL 62
JASP 10	iii.2013	MOL 63
JASP 11	iii.2013	MOL 64
JASP 12	iii.2013	MOL 65
JASP 13	iii.2013	MOL 66
JASP 14	iii.2013	MOL 67
JASP 15	iii.2013	MOL 68
JASP 16	iii.2013	MOL 69
JASP 17	iii.2013	MOL 70
RTSP 1	xii.2013	MOL 319
RTSP 2	xii.2013	MOL 320
RTSP 3	xii.2013	MOL 321
RTSP 4	xii.2013	MOL 322
RTSP 5	xii.2013	MOL 323
RTSP 6	xii.2013	MOL 324
RTSP 7	xii.2013	MOL 325
PMPR 1	ix.2013	MOL 80
PMPR 2	ix.2013	MOL 81
PMPR 3	ix.2013	MOL 82
PMPR 4	ix.2013	MOL 83
PMPR 5	ix.2013	MOL 84
PMPR 6	ix.2013	MOL 85
PMPR 7	ix.2013	MOL 86
PMPR 8	ix.2013	MOL 87
PMPR 9	iii.2014	MOL 97
PMPR 10	iii.2014	MOL 99
PMPR 11	iii.2014	MOL 178
PMPR 12	iii.2014	MOL 225
PMPR 13	iii.2014	MOL 226
PMPR 14	iii.2014	MOL 228
PMPR 15	iii.2014	MOL 229
PMPR 16	iii.2014	MOL 230
PMPR 17	iii.2014	MOL 231
PMPR 18	iii.2014	MOL 232
SISC 1	x.2013	MOL 88

Tabela 2.6. Número de identificação dos vouchers de *Adhemarius eurysthenes* analisados (códigos conforme Tabela 2.1).

Código	Data de coleta	Voucher
SISC 2	x.2013	MOL 89
SISC 3	x.2013	MOL 90
SISC 4	x.2013	MOL 91
SISC 5	x.2013	MOL 92
SISC 6	x.2013	MOL 93
SISC 7	iii.2014	MOL 246
SISC 8	iii.2014	MOL 247

Tabela 2.7. Abrangência de cada marcador nos 109 indivíduos de *Adhemarius eurysthenes* amostrados (códigos conforme Tabela 2.1).

Indivíduos	COI	<i>wingless</i>	CAD
ARES 1	X	X	X
ARES 2	X	X	X
ARES 3	X	X	X
ARES 4	X	X	X
ARES 5	X	X	X
ARES 6	X	X	X
ARES 7	X	X	-
ARES 8	X	X	X
ARES 9	X	X	X
ARES 10	X	X	X
ARES 11	X	X	-
ARES 12	X	X	X
ARES 13	X	X	X
ARES 14	X	X	X
ARES 15	X	X	X
ARES 16	X	X	X
FCRJ 1	X	X	X
FCRJ 2	X	X	X
FCRJ 3	X	X	X
FCRJ 4	X	X	X
FCRJ 5	X	X	X
FCRJ 6	X	X	-
FCRJ 7	X	X	-
FCRJ 8	X	X	-
FCRJ 9	X	X	-
FCRJ 10	X	X	-
FCRJ 11	X	X	-
SORJ 1	X	X	-
SORJ 2	X	X	-
SORJ 3	X	X	-
SORJ 4	X	X	-
SVSP 1	X	X	X
SVSP 2	X	X	X
SVSP 3	X	X	X
SVSP 4	X	X	-
SVSP 5	X	X	-
SVSP 6	X	X	-
SVSP 7	X	X	X
BOSP 1	X	X	-
BOSP 2	X	X	-
BOSP 3	X	X	X
BOSP 4	X	X	-
BOSP 5	X	X	-
BOSP 6	X	X	-
BOSP 7	X	-	-
BOSP 8	X	X	-

Tabela 2.7. Abrangência de cada marcador nos 109 indivíduos de *Adhemarius eurysthenes* amostrados (códigos conforme Tabela 2.1).

Indivíduos	COI	<i>wingless</i>	CAD
BOSP 9	X	X	-
BOSP 10	X	X	-
BOSP 11	X	X	-
BOSP 12	X	X	-
BOSP 13	X	X	-
BOSP 14	X	X	-
BOSP 15	X	X	-
BOSP 16	X	X	X
BOSP 17	X	X	X
BOSP 18	X	X	X
BOSP 19	X	X	X
BOSP 20	X	X	X
PASP 1	X	X	X
JASP 1	X	X	X
JASP 2	X	X	X
JASP 3	X	X	X
JASP 4	X	X	X
JASP 5	X	X	X
JASP 6	X	X	-
JASP 7	X	X	-
JASP 8	X	X	-
JASP 9	X	X	-
JASP 10	X	X	-
JASP 11	X	X	-
JASP 12	X	X	-
JASP 13	X	X	-
JASP 14	X	X	-
JASP 15	X	X	-
JASP 16	X	X	-
JASP 17	X	X	-
RTSP 1	X	X	X
RTSP 2	X	X	X
RTSP 3	X	X	X
RTSP 4	X	X	X
RTSP 5	X	X	X
RTSP 6	X	X	-
RTSP 7	X	X	-
PMPR 1	X	X	X
PMPR 2	X	X	X
PMPR 3	X	X	X
PMPR 4	X	X	-
PMPR 5	X	X	X
PMPR 6	X	X	X
PMPR 7	X	X	X
PMPR 8	X	X	X
PMPR 9	X	X	X

Tabela 2.7. Abrangência de cada marcador nos 109 indivíduos de *Adhemarius eurysthenes* amostrados (códigos conforme Tabela 2.1).

Indivíduos	COI	<i>wingless</i>	CAD
PMPR 10	X	X	-
PMPR 11	X	X	-
PMPR 12	X	X	-
PMPR 13	X	X	-
PMPR 14	X	X	-
PMPR 15	X	X	-
PMPR 16	X	X	-
PMPR 17	X	X	-
PMPR 18	X	X	-
SISC 1	X	X	X
SISC 2	X	X	X
SISC 3	X	X	X
SISC 4	X	X	X
SISC 5	X	X	X
SISC 6	X	X	-
SISC 7	X	X	-
SISC 8	X	X	-

Capítulos 3

Descrição do ovo e primeiro ínstar de *Orecta lycidas* (Boisduval, [1875]) (Lepidoptera, Sphingidae)

Resumo

Orecta lycidas pode ser encontrada na Mata Atlântica do sul e sudeste do território brasileiro e do leste da Bolívia ao Uruguai. As populações brasileiras são identificadas como *O. l. lycidas*, enquanto as demais como *O. lycidas eos*. A fraca representação da espécie nas coleções científicas nacionais e estrangeiras tem levado os especialistas a tratá-la como rara, a ponto de ter-se cogitado a sua inclusão na lista de espécies quase ameaçadas de extinção para o Estado de São Paulo. Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a morfologia dessa espécie e considerando a importância das formas imaturas para o entendimento da biologia e da história evolutiva de Sphingidae, bem como a dificuldade de se conseguir amostras para esse fim, foi realizado um estudo da morfologia externa do ovo e do primeiro ínstar de *O. lycidas*. As poucas informações encontradas na literatura para imaturos de Sphingidae se resumem a descrições sucintas do padrão de coloração e da morfologia dos ínstars tardios (maduros). É apresentada a primeira descrição com detalhes da quetotaxia de uma espécie de Ambulycini. Como tipicamente se observa nas larvas de Sphingidae, os exemplares analisados apresentaram um longo processo dorsal mediano partindo do oitavo segmento abdominal, medindo cerca de 4 mm nesta espécie. Larvas de primeiro ínstar de *O. lycidas* com cerca de 7,5 mm de comprimento, desconsiderando o processo de A8. Corpo densamente coberto por pequenas cerdas simples com as pontas em forma de “v” agrupadas aos pares; em A8 somente até a base do processo. Processo de A8 coberto por cerdas menores isoladas e com pontas simples, com duas cerdas conspícuas de pontas levemente dilatadas situadas em calazas opostas, uma localizada dorsalmente e outra ventralmente, na extremidade distal. Quetotaxia do primeiro ínstar semelhante àquela dos demais representantes da família. Ovo, de formato elíptico, com maior diâmetro medindo 2 mm (n=1). Este trabalho servirá para que estudos futuros sobre a sistemática de grupos filogeneticamente próximos a *O. lycidas* possam incluir caracteres de estágios imaturos na recuperação das hipóteses de relacionamento.

1. Introdução

Esfingídeos são lepidópteros que atingem grandes densidades corporais. Sua forte musculatura lhes confere capacidade para um voo estável e vigoroso, sendo comumente confundidos com beija-flores. Dadas essas características, alguns desses insetos são conhecidos por realizarem migrações a longas distâncias (Schreiber, 1978; Kitching & Cadiou, 2000). Esfingídeos da tribo Ambulycini (Smerinthinae) apresentam pequeno, médio e grande porte e seus gêneros neotropicais compreendem variações entre os tamanhos médio e grande (Kitching & Cadiou, 2000, Coleção de Lepidoptera do Museu de Zoologia da USP). As lagartas são robustas e facilmente identificadas pela sua morfologia. Possuem importante papel ecológico na ciclagem de nutrientes (Begon *et al.* 2006, sobre Lepidoptera) e no consumo primário de plantas com altos teores de compostos tóxicos, como as da família Lauraceae (Janzen, 1984).

No Brasil, ao menos parte das populações da maioria das espécies de Ambulycini pode ser encontrada em fragmentos de Mata Atlântica, especialmente nas formações submontana e montana das fitofisionomias de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa (Duarte, dados não publicados sobre registros e prováveis ocorrências de Sphingidae em território brasileiro). Este é o bioma mais ameaçado do Brasil, restando em torno de 13% de remanescentes florestais acima de 3 ha, e apenas 8,5% de fragmentos com mais de 100 ha (INPE, 2013). Cerca de 70% de todo o território do Estado de São Paulo foi originalmente composto pelo bioma da Mata Atlântica. Apesar dessa porcentagem ter diminuído drasticamente, São Paulo é um dos Estados, ao lado do Paraná, onde se encontram os maiores remanescentes de florestas (Scaramuzza, 2011).

Devido aos ciclos econômicos do desenvolvimento brasileiro e seu sistema fundiário desigual, à expansão dos centros urbanos e ao crescimento populacional desordenado, o bioma Mata Atlântica tem sofrido forte pressão e impactos de natureza antrópica (Galindo-Leal & Câmara, 2005). Atualmente, sua área de abrangência apresenta a maior densidade populacional, comparada aos demais biomas brasileiros, e é a principal região de atividades econômicas do país (IBGE, 2011). Tal cenário resultou em uma modificação da paisagem, com a perda de habitats e a formação de fragmentos reduzidos de vegetação nativa, ilhando as populações de diversas espécies selvagens. Consequentemente, muitas dessas populações diminuíram, influenciadas pelo aumento do efeito de borda, diminuição da dispersão e da migração (Tabarelli *et*

al., 1999; Rambaldi & Oliveira, 2003). Com isso, espécies desapareceram de regiões onde outrora podiam ser encontradas. O intenso desmatamento registrado para Minas Gerais (INPE, 2012), por exemplo, pode ser um dos responsáveis pela diminuta série de exemplares de *Orecta lycidas lycidas* (Boisduval, [1875]) (Lepidoptera, Sphingidae, Smerinthinae, Ambulycini) coletada na região leste do Estado.

De todos os registros de *O. l. lycidas*, parte significativa está restrita a uma faixa de Mata Atlântica que percorre as regiões sudeste e sul do Brasil, do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul, compreendendo também a porção leste de Minas Gerais. A essa distribuição costuma-se associar a subespécie *O. l. lycidas* (ver também Rothschild & Jordan, 1903), ficando os demais registros, como os de outros países da América do Sul, reunidos sob o táxon subespecífico *O. lycidas eos* (Burmeister, 1875). Recentemente, populações provenientes de Feira Nova, no Maranhão, e de Goiás, foram reconhecidas como pertencentes a uma nova espécie, *Orecta comus* Haxaire & Mielke, 2013. A não ocorrência de *O. l. lycidas* fora do domínio da Mata Atlântica reforça, portanto, a distribuição geográfica restrita da espécie.

No Brasil, tem-se coletado adultos desde antes mesmo do sol se pôr completamente até o fim da primeira hora após este evento. Na Estação Biológica de Boraceia, Salesópolis, São Paulo, foram coletados esfingídeos de 1940 a 2004 (Duarte *et al.*, 2008) e apenas dois exemplares coletados em 1941 estão depositados na coleção do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (Mielke & Haxaire, 2013). Em 2008, através da disciplina de graduação “Entomologia de Campo”, ministrada pelo professor Dr. Marcelo Duarte da Silva aos alunos da Universidade de São Paulo, foi coletado um macho, que encontra-se na coleção do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), ainda outro exemplar macho foi encontrado entre o material dessa expedição que não havia sido montado. Para os demais registros, dentro e fora do território brasileiro, *O. lycidas* está igualmente representada por poucos indivíduos nas coleções científicas (Duarte *et al.*, 2008), sugerindo uma baixa densidade populacional da espécie.

Orecta Rothschild & Jordan, 1903, *Trogolegnum* Rothschild & Jordan, 1903, *Adhemarius* Oiticica, 1939 e *Protambulyx* Rothschild & Jordan, 1903 representam os gêneros neotropicais de Ambulycini. As lagartas desses esfingídeos podem ser distinguidas pelo corpo alongado e relativamente delgado, estreitando-se da extremidade posterior até o vértice da cabeça, projetado anteriormente em seus ínstaros

mais tardios. Tal característica proporciona à cabeça uma forma aproximadamente piramidal. Em *Adhemarius*, com frequência, o vértice apresenta um prolongamento em forma de espinho, que se reduz com o passar das mudas e tem quase o mesmo tamanho do processo de A8 nos primeiros ínstaes. O corpo das lagartas de *Adhemarius* e *Protambulyx* é revestido por pequenas verrugas ou saliências semiesféricas com coloração diferente da cor predominante de fundo. Essas lagartas apresentam um padrão de coloração críptico e podem ser encontradas alimentando-se de plantas jovens de famílias específicas para cada espécie, como por exemplo *Protambulyx strigilis* (Linnaeus, 1771) em Anacardiaceae e Simaroubaceae (Miller *et al.*, 2006; Tuttle, 2007; Janzen & Hallwachs, 2000), e *Adhemarius eurysthenes* (Felder, [1874]) em Lauraceae (Oehlke, 2000).

Burmeister (1879), em seu *Atlas de la description physique de la République Argentine*, fez uma breve descrição da morfologia e biologia de *O. lycidas eos*. O autor associou a dieta da lagarta a *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez (Lauraceae). Zikán (1928) descreveu sucintamente a biologia de *O. lycidas* com base em três lagartas encontradas em um arbusto identificado por “canelinha”, na Fazenda dos Campos, na parte sudeste do Estado de Minas Gerais. No artigo, é relatado o momento em que as lagartas buscaram o solo para empupar, a profundidade que cavaram para este fim e o tempo que levaram até a emergência do adulto. Apesar de descrever algumas características morfológicas do ínstar tardio e da pupa, o trabalho está pobremente ilustrado com poucos detalhes do estágio larval, da pupa e de um pequeno ramo da planta hospedeira. Sendo assim, a informação sobre a morfologia dos estágios imaturos de *O. lycidas* ainda é incompleta, não obstante a grande contribuição dos artigos supracitados.

Alguns estudos têm demonstrado a importância das larvas de primeiro ínstar para a resolução de relacionamentos filogenéticos em níveis pouco inclusivos (Freitas & Brown, 2004; Duarte *et al.*, 2005). As peças bucais, especialmente as mandíbulas e a hipofaringe, apresentam caracteres que podem ser úteis para o estudo filogenético de níveis taxonômicos inferiores à família (Stehr, 1987). Ademais, levando em consideração a escassez de hipóteses de relacionamentos usando caracteres morfológicos em Sphingidae, publicadas em revistas de grande circulação, e o fato das filogenias recentes com dados de imaturos demonstrarem: i – o pequeno conhecimento sobre a variação da quetotaxia dentro dos grupos, o que impede a realização de trabalhos comparativos; ii – a possível influência das plantas hospedeiras sobre a

distribuição das cerdas secundárias no ínstares mais avançados de algumas espécies (Kitching, 2002, 2003), fica ainda mais evidente a importância de trabalhos descritivos sobre o primeiro ínstar. Da ausência dessas informações para as lagartas de Ambulycini surge a necessidade de publicações que levantem detalhes da morfologia de primeiro ínstar e, para tanto, este trabalho visa apresentar a descrição morfológica do ovo e do primeiro estágio larval de *O. l. lycidas*.

1.1. Objetivo

Descrever o ovo e o primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas* para contribuir com o conhecimento de imaturos de Ambulycini e dar suporte a futuros trabalhos sistemáticos com a tribo.

2. Material e Métodos

Os seis ovos postos pela única fêmea coletada na noite de 8 de março de 2013, dentro de uma residência no município de Ponta Grossa, Paraná, eclodiram no trajeto até a cidade de São Paulo, SP, Brazil. Nenhuma lagarta sobreviveu ao transporte. As larvas foram fixadas em água fervente e, em seguida, conservadas em álcool 70 °GL, junto com o que sobrou dos ovos, para posterior estudo.

Foram usadas uma lagarta e quatro sobras de ovos para a produção de imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens foram realizadas no Laboratório de Microscopia do MZUSP em um microscópio Carl Zeiss LEO 440. Um ovo foi extraído inteiro de dentro do abdômen da fêmea após dissecação. O abdômen separado foi submetido ao banho-maria em uma solução de água com detergente permitindo a extração do material em bom estado de conservação. Este ovo também foi fotografado com auxílio da MEV.

Com o material restante, e de posse das imagens obtidas com MEV, foram feitas ilustrações para descrever a quetotaxia e os detalhes da morfologia externa. Foi utilizada câmara clara acoplada ao estereomicroscópio para desenhar as estruturas. A interpretação e a descrição da morfologia larval seguiram Peterson (1962) e Stehr (1987) e, para ultraestrutura do cório do ovo, Downey & Allyn (1981). O material voucher encontra-se depositado no MZUSP.

3. Resultados

3.1. Descrição do material

Ovo (Figuras 3.8-11). Elíptico, com diâmetro médio no eixo longitudinal de 1,88 mm (n=5) e 1,66 mm (N=1) no eixo transversal. Ovo retirado do abdômen da fêmea de tom amarelado, textura predominantemente lisa. Com minúsculas elevações pontuais agrupadas em conjunto de duas a cinco. Cada um desses agrupamentos, de cerca de 10 µm situado sobre pequenas depressões. Distância entre os poros variando aproximadamente de 20 a 90 µm. Com 12 ou 13 aberturas na micrópila (n=3). Micrópila assemelhando-se a uma estrela de muitas pontas; cada vértice correspondendo a uma abertura. Células do ânulo delimitadas por cristas de baixo perfil. Roseta formada tipicamente por 11 ou 12 células (N=3). Área micropilar, correspondendo ao ânulo, situada em uma fóvea, com diâmetro médio de 140 µm (N=4). Cristas na zona de transição progressivamente mais baixas. Células da roseta petaliformes. Demais células com formato aproximado de um hexágono; raramente com formato diferente. Ovos postos deitados. Eclosão pelo polo oposto à micrópila.

Primeiro ínstar (Figuras 3.1-7, 3.12-17). Cabeça (Figuras 3.2-6). Cabeça hipognata e arredondada, mais larga do que longa e aparentemente com tegumento mais espesso que o restante do corpo. Labro com entalhe raso na forma de um “V” invertido. Sutura ecdisial pouco evidente. Anteclípeo com cerca de metade do comprimento do frontoclípeo. Seis estemas de cada lado da cabeça dispostos em um arco normal, com o estema 5 posicionado ventralmente próximo ao escapo antenal; estema 6 tipicamente mais próximo do estema 4 do que do estema 1. Todos os estemas de mesmo tamanho (diâmetro médio 30µm), exceto estema 2, ligeiramente menor, com diâmetro médio de 25µm. Cerdas finas e pequenas compõem a quetotaxia da cabeça; cerdas nunca maiores que o flagelo antenal. Mandíbula com cinco dentes ligeiramente arredondados. Par de cerdas da mandíbula localizadas na face externa; a maior, com cerca de duas vezes o tamanho da menor, situada próximo à mandíbula, como normalmente se observa em Lepidoptera (ver também Duarte *et al.* 2005, 2009). O mapa setal encontra-se representado nas Figuras 3.2 e 3.3.

Cabeça com 17 pares de cerdas e seis pares de poros visíveis (labro estudado separadamente, Figura 3.4). Alguns poros não puderam ser observados devido à textura

granulosa da cabeça (Figura 3.11). Labro aparentemente sem poros. Microcerdas ausentes. Cerdas e poros distribuídos em grupos como segue:

Grupo adfrontal (AF): AF1 e AF2 alinhados verticalmente e paralelas aos ramos laterais da sutura epicranial; AF2 abaixo do vértice superior do frontoclípeo. AFa não encontrado.

Grupo anterior (A): A2 e A3 subiguais e cerca da metade do comprimento de A1; A2 pouco mais próxima de A3 do que de A1. Aa não encontrado.

Grupo clipeal (C): C1 e C2 muito próximas e com mesmo comprimento. C2 aparentemente na mesma linha que marca o limite do labro.

Grupo frontal (F): F1 próxima à linha mediana. Fa aparentemente ausente.

Grupo lateral (L): L1 equidistante de P2 e S2. La próximo, um pouco mais ventral.

Grupo microdorsal (MD): Apenas MDa pode ser observado, próximo à região occipital, aproximadamente equidistante de P2 e L1.

Grupo microgenal (MG): Apenas MGa foi observado, próximo a S3.

Grupo posteriodorsal (P): P1 mais próxima de AF2 e mais afastada da sutura epicranial; P2 localizada próximo da sutura epicranial na região onde se observa um leve entalhe. Pa mais ventral e externo a P1. Pb não encontrado.

Grupo estematal (S): S1, S2 e S3 com aproximadamente o mesmo tamanho. S1 interno ao semicírculo formado pelos estemas, mais próximo dos estemas 2 e 3. S2 mais dorsal e afastada, porém mais próximo do estema 1 do que de outros. S3 também afastada dos estemas e igualmente distante dos estemas 1 e 6, um pouco mais dorsal que S1 e mais ventral que S2. Sa mais próximo de S2 e do estema 1. Sb anterior e mais ventral em relação ao estema 3, mais próximo deste que do estema 4.

Grupo subestematal (SS): Cerdas um pouco mais longas que as cerdas do grupo stemmatal. Cerdas aproximadamente equidistantes. SS2 mais dorsal e SS1 mais ventral. SS3 um pouco mais longa que as demais. SSa não encontrado.

Quetotaxia do labro (Figura 3.4): M1, M2 e M3 formando um arco inclinado sutil que atravessa verticalmente o comprimento do labro. M2 mais longa que M3; M1 mais curta das três. M1 mais dorsal e próxima da linha média; M3 mais ventral e distante da linha média. LA1, LA2 e LA3 repetindo o mesmo padrão encontrado para as do grupo M, porém formando arco com inclinação invertida. Grupo LA mais ventral

e próximo à borda lateral do labro. LA3 um pouco mais próxima da linha média. Um poro bem próximo de M3, dorsal a esta cerda.

Tórax (Figura 3.7). Escudo protorácico com depressões laterais. T2 e T3 dividido em oito anéis (“*annulets*” *sensu* Stehr, 1987) cada. Espiráculo protorácico com cerca da metade do diâmetro do espiráculo de A8, ambos alinhados. Pernas torácicas com cinco artículos e uma garra terminal. Coxa com três cerdas, as duas da face interna mais robustas. Fêmur com duas cerdas robustas na face interna. Tíbia com seis cerdas distribuídas em anel em sua porção distal, levemente direcionadas para o ápice; as duas cerdas mais internas proporcionalmente mais desenvolvidas. Tarso com quatro cerdas, a mais isolada da face externa com diâmetro distintamente menor, as três da face interna robustas e projetando-se apicalmente sobre a garra terminal. Quetotaxia dos segmentos torácicos conforme descrição abaixo (ver também Figura 3.7), todas as cerdas partindo de calazas.

Protórax (Figura 3.7). Escudo protorácico com seis pares de cerdas dispostas próximo às margens e com aproximadamente o mesmo comprimento. D1, próxima à margem posterior do escudo, porém mais anterior do que D2, mais próxima da linha média do que XD1. D2 próxima à margem posterior e mais lateral do que D1. XD2 na mesma linha de XD1, porém mais lateral. SD1 pouco mais dorsal que SD2, esta mais próxima à margem lateral do escudo. Poros do escudo protorácico aparentemente ausentes. L1 e L2 unidas basalmente; L2 maior e mais ventral do que L1. Grupo L mais ventral que o espiráculo. SV2 um pouco mais ventral e anterior a SV1, com aproximadamente o mesmo tamanho. V1 pequena, visível próximo à base da coxa protorácica e posterior a esta.

Mesotórax e metatórax (Figura 3.7). Oito pares de cerdas. D1, D2, SD1 e SD2 sobre o quarto anel. D1 e D2 de mesmo tamanho. D1 um pouco mais anterior que D2; D2 mais ventral. SD2 menor que SD1 e mais dorsal. L1 como única cerda do grupo L presente, com aproximadamente o mesmo tamanho de SV1. SV2 maior que as duas últimas. SV1 e SV2 na mesma posição em relação ao eixo longitudinal, porém SV2 anterior a SV1. V1 com a mesma localização encontrada no protórax.

Abdômen (Figura 3.7). Processo de A8 com cerca de 4 mm de comprimento, recoberto por minúsculas cerdas isoladas, com os pares de cerdas de pontas duplas mais espaçadas do que no restante do corpo. Ápice do processo com dois vértices alinhados

verticalmente, na extremidade dos quais partem duas cerdas conspícuas a partir de calazas características, direcionadas obliquamente em relação ao eixo longitudinal do processo (Figura 3.13). Ganchos das pernas abdominais em mesossérie homóide uniordinal. Ganchos protegidos por tiras de projeção membranosa. Espiráculos de A1-A8 colineares. Espiráculos de A1-A6 com mesmo tamanho, medindo cerca de um quarto do diâmetro do espiráculo de A8. Diâmetro do espiráculo de A7 medindo cerca de metade do diâmetro do espiráculo de A8. A10 terminando em três lobos angulares, um dorsal e dois laterais. As cerdas primárias dos segmentos abdominais estão distribuídas como segue. Todas as cerdas partem de calazas.

Segmentos abdominais 1, 2 e 7 (Figura 3.7). Seis pares de cerdas primárias com aproximadamente o mesmo tamanho, exceto V1 menor. MD1, SD2, L3 e MV3 não observadas. D1 sobre o terceiro anel, levemente mais dorsal que D2. D2 sobre o sexto anel. SD1 logo acima do espiráculo, no quarto anel. L1 lateral, no segundo anel, um pouco abaixo da linha do espiráculo. L2 mais longo e mais ventral que L1, aparentemente sobre o terceiro anel. SV1 e SV2 muito próximas sobre o quinto anel; SV1 mais ventral. V1 em posição ventral, aparentemente sobre o sexto anel.

Segmentos abdominais 3-6 (Figura 3.7). D1, D2, SD1, L1 e L2 em situação idêntica a dos segmentos descritos acima. SV1 e SV2 com o mesmo tamanho, sobre a face externa das pernas. SV1 em posição antero-lateral. SV2 mais anterior e interna do que SV1. SV3 aparentemente ausente. V1 sobre a face interna das pernas como o mesmo tamanho das outras duas.

Segmento abdominal 8 (Figura 3.7). D1 erguendo-se obliquamente a partir de um curto lobo no ápice do processo dorsal mediano. D2 ausente. SD1, L1, L2, SV1, SV2 e V1 como nos segmentos A1, A2 e A7. SD2 visível próximo ao espiráculo e muito reduzida.

Segmento abdominal 9 (Figura 3.7). D1 posterior ao processo de A8. D2 anterior e mais lateral ao processo de A8 do que D1. SD1 mais ventral e levemente posterior a D2. L1 próximo à base do escudo anal, na linha do espiráculo de A8. SV1 próximo ao final do afunilamento formado pelo lobo lateral de A10 e o limite posterior de A8.

Segmento abdominal 10 (Figura 3.7). Posicionamento das cerdas nos lobos angulares de A10 lateralmente assimétrico e algumas cerdas aparentemente sem posição específica. L1 bem espaçada de L2 e L3, próximo ao limite anterior dos lobos

angulares laterais. Três cerdas robustas direcionadas ventralmente consideradas como sendo, da mais anterior para a mais posterior, SV3, SV2 e SV1, posicionadas sobre a borda inferior dos lobos laterais. D1 e D2 sobre o escudo anal entre várias outras cerdas de mesmo tamanho; D2 próxima ao ápice do escudo anal.

Os exemplares do primeiro ínstar de *O. lycidas* possuem corpo eruciforme com cerca de 7,0 mm (n=2) de comprimento da ponta da cabeça até a extremidade posterior da placa anal (A10) (Figura 3.1). Esse é provavelmente o tamanho com que deixam o ovo. De T2 a A8 os segmentos são divididos por oito anéis, mas esse número pode variar para menos ou para mais de forma aparentemente aleatória. O corpo é densamente revestido por pequenas cerdas de pontas duplas agrupadas aos pares. No primeiro segmento torácico elas podem ser observadas nas regiões mais membranosas ao redor das cerdas primárias e estão ausentes na região do escudo pró-torácico. Estas cerdas duplas distribuem-se em uma fileira única ao longo de cada anel a partir de T2 até A9, porém no tórax são escassas na região ventral. Aparentemente a coloração do corpo é homogênea, com manchas apenas ao longo do processo de A8.

O ovo dissecado tem uma estrutura coriônica aparentemente incompleta quando visualizado pela MEV, o que se manifesta principalmente pelas cristas do ânulo mais baixas e estreitas que as observadas nos demais ovos.

Figura 2.1. Hábito da larva de primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas*.

Figura 3.2-6. Cápsula cefálica e aparelho bucal da larva de primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas*. 2, Cápsula cefálica em vista frontal. 3, Cápsula cefálica em vista lateral. 4, Labro. 5 e 6, Mandíbula direita (5, face externa e 6, face interna). Para abreviações, ver texto sobre a quetotaxia.

7

Figura 3.7. Segmentos torácicos e abdominais da larva de primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas*. Quetotaxia em vista lateral. Abreviações (para quetotaxia ver no texto): A, segmento abdominal; T, segmento torácico.

Figuras 3.8-11. Ovo de *Orecta l. lycidas*. 8. Vista laterofrontal; região da micrópila (seta). 9. Ânulo. 10. Detalhe do cório; poro (seta). 11. Detalhe da roseta.

Figuras 3.12-17. Larva de primeiro ínstar de *Orecta l. lycidas*. 12. Cabeça, vista antero-ventral. 13. Espiráculo de A8. 14. Detalhe da extremidade distal do processo dorsal de A8 em vista lateral; cerdas táteis (setas). 15. Perna metatorácica, vista lateroanterior. 16. Antena, vista frontal. 17. Perna abdominal esquerda de A6, vista ventral. Abreviações: ant 2, segundo antenômero; ant 3, terceiro antenômero; cx, coxa; fm, fêmur; tb, tíbia; ta, tarso.

4. Discussão

Como nos exemplares aqui descritos, as lagartas de Sphingidae de primeiro ínstar possuem cabeça geralmente arredondada e processo dorsal de A8 relativamente

longo (Bell & Scott, 1937, Stehr, 1987). Tal como no material estudado, o processo dorsal de A8 é sempre reto, afinando gentilmente da base até uma pequena ponta bífida com duas cerdas. As lagartas da tribo Ambulycini e de alguns representantes da tribo Smerinthini, são caracterizadas por possuírem a cabeça em formato triangular a partir do segundo ínstar (Bell & Scott, 1937). Nestes casos, elas possuem corpo cilíndrico que afina mais bruscamente a partir do primeiro segmento abdominal até a grande cabeça triangular (Bell & Scott, 1937).

A presença de ganchos em mesossérie uniordinal nos ínstaes jovens contradiz a generalização encontrada em Peterson (1962), que caracteriza os ganchos de esfingídeos como mesosséries biordinais. Uma provável explicação para esse fato é que o autor pode não ter analisado cuidadosamente os ínstaes mais iniciais, supondo que essa característica atinja outro estado com o passar das mudas (como, de fato, ocorre em outros grupos de Lepidoptera – ver Duarte *et al.* 2005). De outro modo, é necessário assumir que as larvas de *O. l. lycidas* apresentam uma configuração inédita para a família, agregando importância filogenética às variações nessa estrutura. A menos que seja analisado o desenvolvimento dos ganchos ao longo do ciclo de vida em outros representantes de Sphingidae, ou estudados ínstaes mais avançados de *O. l. lycidas*, essa questão continua em aberto.

O formato dos ovos em Sphingidae é aproximadamente esférico ou suavemente oval (Bell & Scott, 1937). Sendo assim, os resultados obtidos para *O. lycidas* se enquadram nas descrições encontradas na literatura. *Oxyambulyx* (*Ambulyx*) *ocellata* põe um pequeno número de ovos, sendo que do total de 371, Mell (1922) obteve apenas 88 ovos viáveis. Essa informação sobre outro representante de Ambulycini sugere que, também para a espécie em estudo, a porcentagem de ovos que completam o desenvolvimento seja bem abaixo da capacidade reprodutiva real da espécie, hipótese que é reforçada pelos registros de indivíduos coletados em amostragens de campo. Mattoni & Penco (2012) a partir de dados da literatura e de suas próprias coletas descrevem que, para a Argentina e o sul do Uruguai, nos melhores dias e localidades pode ser coletado no máximo um indivíduo adulto.

Bell & Scott (1937) descrevem superficialmente a quetotaxia larval dos esfingídeos do que era considerada a Índia Britânica mais as localidades de Ceylon e Burma, indicando a presença de apenas quatro pares de cerdas (ditas principais), identificadas pelo seu posicionamento como subdorsal, dorso-lateral, supraespiracular

e subspiracular. Os autores destacam que em T2 e T3, estas cerdas estão alinhadas em fileira aproximadamente no meio de cada segmento. Tal padrão foi verificado no material estudado, formado pelas cerdas D1, D2, SD1 e SD2, embora as cerdas L1, SV1, SV2 e V1, também encontradas, não tenham sido discriminadas pelos referidos autores. Concordantemente com o que foi observado, eles completam que, nos segmentos abdominais, estas cerdas não se encontram enfileiradas. Bell & Scott (1937) consideraram presentes todas as cerdas principais do segmento A8, com uma diferença apenas no posicionamento invertido das cerdas dorso-laterais e subdorsais. Por não se encontrar demonstrada tal observação, acredita-se que estes autores identificaram equivocadamente as cerdas deste segmento. Além do mais, uma das sinapomorfias de Bombycoidea listadas por Minet (1994) é a presença das cerdas D1 em um escolo médio-dorsal, sendo, portanto, uma plesiomorfia em Sphingidae. Nossos resultados estão de acordo com as observações deste autor, motivo pelo qual interpretamos as cerdas presentes no ápice do processo dorsal de A8, que de outro modo deveriam ser consideradas uma neoformação, homólogas a um dos pares das cerdas do grupo D.

Esfingídeos tipicamente apresentam proles solitárias (Stehr, 1987; Janzen, 1984; Peterson, 1962). Apesar de não ter sido possível investigar essa característica com as nossas amostras, a presença de apenas três lagartas em um arbusto relatada por Zikán (1928), além de outros grupos próximos confirmarem esse comportamento (observação pessoal de uma lagarta de *Protambulyx* sp. em aroeira), nos permite inferir que em *O. l. lycidas* os ovos sejam postos isoladamente e as lagartas sejam solitárias.

Segundo Zikán (1928), o último ínstar possui coloração verde-clara, mede 75 mm de comprimento e seu formato cilíndrico é afilado em direção à parte anterior, terminando em uma cápsula cefálica apontada para frente, bem como o é na região terminal posterior do corpo. Cada segmento do corpo da lagarta está dividido em oito anéis, que são densamente cobertos por verrugas. O quarto anel dos segmentos A4-A10 possui dorsalmente uma mancha circular castanha. Lateralmente se estende uma linha amarela longitudinal que vai do topo da cápsula cefálica e se une depois da inserção do processo dorsal de A8. Dessa linha longitudinal correm sete linhas de mesma cor na direção antero-ventral, apontando para a base do corpo; uma oitava mais fraca se estende sobre o escudo anal. Possuem o processo de A8 com 10 mm de comprimento, reto, direcionado horizontalmente para trás, castanho e densamente coberto com verrugas (Zikán, 1928). A pupa também é descrita no artigo e Zikán menciona que ela

é bastante agitada, mede 45 mm de comprimento, tem a coloração castanho-escuro e um cremaster de 5 mm. Ela foi encontrada a aproximadamente 10 cm abaixo da superfície em um frágil casulo oval. A duração dessa fase se aproximou de oito meses, do que o autor conclui que, provavelmente, *O. lycidas* possui apenas uma geração por ano.

A descrição de um ínstar de *O. lycidas eos* apresenta características de coloração um pouco distintas daquelas apresentadas por Zikán (1928) (Burmeister, 1879). Não é mencionado qual foi o ínstar estudado, mas pela presença de listras oblíquas e de uma cabeça triangular, ausentes no primeiro ínstar, subentende-se tratar da descrição de um estágio mais avançado. A coloração neste caso é descrita como verde-azulado tendendo ao esbranquiçado, sendo as linhas laterais oblíquas e a linha longitudinal de cor branca. Essas diferenças podem ser o resultado de diferenças mais profundas entre as duas subespécies e um estudo futuro mais detalhado, comparando os estágios imaturos de ambas, poderá dar suporte a uma eventual distinção das subespécies em duas espécies válidas.

Em suas filogenias sobre a tribo Acherontini e o gênero *Acherontia* Laspeyres, 1809, Kitching (2002, 2003) analisou respectivamente oito e sete caracteres de origem larval, dos quais, 12 são repetidos em ambas as análises. A maior parte destes caracteres se refere a variações de forma e cor das estruturas das lagartas. A presença e ausência de cerdas longas sobre o tórax e o abdômen (Kitching, 2002) e o tamanho das cerdas sobre o tórax e o abdômen no último ínstar (Kitching, 2003) são abordagens diferentes das mesmas estruturas: cerdas do tórax e do abdômen, e são os únicos caracteres mais relacionados à quetotaxia. Moss (1920) observou que, quando a lagarta de *Manduca sexta paphus* (Cramer, 1779) apresenta a superfície dorsal com coloração uniformemente esverdeada, ela é lisa e desprovida de cerdas nessa região, já quando o dorso é mais claro e ela é encontrada nas folhas brancas de *Solanum grandiflorum* (Solanaceae), está geralmente coberta por cerdas muito finas e claras – característica confirmada por Kitching (2002). Dessa forma, observa-se uma enorme carência de estudos clássicos sobre a quetotaxia de Sphingidae, como aqueles comumente realizados com outros grupos de Lepidoptera (Duarte *et al.*, 2005).

5. Conclusão

Assim como para outros grupos de Lepidoptera, as lagartas de primeiro ínstar e os ovos de *O. lycidas* apresentam uma gama de características morfológicas que poderiam incorporar trabalhos mais abrangentes sobre a história evolutiva de grupos mais inclusivos e contribuir para o esclarecimento de hipóteses de relacionamento. Considerando que poucos trabalhos morfológicos com imaturos de esfingídeos têm sido publicados, este trabalho também é um apelo para que mais autores venham a publicar descrições precisas e detalhadas, bem como imagens, que permitam o uso de caracteres das larvas de esfingídeos na construção de hipóteses filogenéticas.

Discussão Geral e Conclusões

Ambulycini foi mais uma vez recuperada como grupo monofilético, tanto pelos marcadores morfológicos como pelos marcadores moleculares e evidência total, corroborando análises anteriores que investigaram apenas parte de seus gêneros. Pela primeira vez, uma análise usando métodos de otimização incluiu todos os dez gêneros da tribo. Nenhuma sinapomorfia morfológica confiável suportando a monofilia da tribo foi encontrada. Aqui, a hipótese filogenética recuperada indicou que *Adhemarius* é um gênero polifilético e carece de revisão taxonômica. A despeito disso, foi corroborada a monofilia de todos os demais gêneros da tribo.

Os Ambulycini neotropicais são representantes de duas linhagens que não possuem um acenstral comum exclusivo. Dessa forma, estipula-se que a diferenciação dos ancestrais dessas linhagens na região da América do Sul se deu de forma independente. A linhagem que inclui *Protambulyx* apresenta distribuição geográfica mais ampla e pode ser encontrada em quatro regiões biogeográficas distintas. Por sua vez, a linhagem aqui denominada como ademariformes tem distribuição geográfica consideravelmente mais restrita, sendo encontrada apenas na Região Neotropical. Outra característica contrastante entre estas linhagens é a família de plantas utilizada como hospedeira por suas larvas. Todos os táxons da linhagem com maior distribuição que têm planta hospedeira conhecida se alimentam de Anacardiaceae, ao passo que todos os ademariformes com registros na literatura utilizam Lauraceae como hospedeiras de imaturos.

Adhemarius eurysthenes é um nome válido para todas as populações amostradas, do Espírito Santo à Santa Catarina. Evidências para o seu tratamento como linhagem evolucionária independente abrangem os três marcadores moleculares estudados, embora a região do COI naturalmente tenha sido a única que permitiu testar a estruturação genética das populações. Inferindo redes de haplótipos com as sequências de COI, foi possível visualizar a distribuição da variabilidade genética entre as populações. ARES apresenta um elevado grau de isolamento baseado em dois fatores: três de seus quatro haplótipos são únicos e estão presentes em pelo menos dois indivíduos; e o único haplótipo compartilhado não é o mesmo encontrado com alta frequência em todas as demais populações. Não obstante, isto pode ser devido a uma amostragem incompleta da diversidade genética da população. Por outro lado, a análise

de variância com componente geográfico corrobora o isolamento de ARES pelo maior valor de F_{ST} que a separa do grupo formado pelas demais populações. Em contrapartida, como tem sido demonstrado para outros organismos voadores, nenhuma correlação existe entre a diferenciação genética e a distância geográfica entre as populações.

A única sinapomorfia morfológica reconhecida atualmente para Ambulycini provém do estágio de pupa e não pode ser avaliada neste trabalho. Estudos de imaturos de Sphingidae são ainda escassos na literatura, embora as informações filogenéticas contidas nestes estágios do ciclo de vida sejam de grande importância (Duarte *et al.*, 2005). Trabalhos utilizando caracteres de imaturos, como o de Kitching (2002), limitam-se ao uso da coloração e da morfologia geral das larvas e das pupas. *Orecta lycidas* é uma espécie pouco representada nas coleções zoológicas. Destacando-se também pela beleza das formas adultas, desde seus primeiros registros tem sido considerada uma espécie rara. Durante a realização deste trabalho, teve-se a oportunidade de descrição de parte do seu ciclo de vida. Sendo um trabalho pioneiro, pouca informação filogenética se pôde extrair dessas amostras, por falta de referências para comparação. A descrição detalhada da quetotaxia de Ambulycini é inédita e serve para fornecer informações para trabalhos futuros usarem como ponto de partida.

Estes resultados contribuem para o entendimento da história evolutiva das espécies neotropicais de Ambulycini e dos padrões históricos de ocupação da Mata Atlântica por estas mariposas, além de auxiliar no embasamento de projetos de conservação deste bioma.

Resumo

A esfingofauna brasileira ainda hoje é pouco conhecida. *Orecta lycidas* (Sphingidae, Smerinthinae, Ambulycini) tem sido considerada uma espécie rara por conta das reduzidas séries de exemplares nas coleções entomológicas, mesmo para as localidades extensivamente amostradas. Até o momento, não se tem uma hipótese filogenética para o relacionamento de todos os gêneros de Ambulycini e, desse modo, pouco se sabe sobre o relacionamento de *O. lycidas* com os táxons geograficamente mais próximos. Uma das espécies neotropicais mais assemelhada a *O. lycidas*, que compartilha uma distribuição geográfica muito parecida e também a mesma família de planta hospedeira das larvas, é *Adhemarius eurysthenes*. Esta espécie está entre as mais abundantes em trabalhos recentes de levantamentos de Sphingidae para localidades de Mata Atlântica em São Paulo, podendo ser coletada em todos os meses do ano. Sendo assim, é possível conseguir, com relativamente pequeno esforço, quantidades de indivíduos satisfatórias para o estudo de suas populações. Neste trabalho, a hipótese filogenética recuperada combinou dados dos genes COI, CAD e *wingless* (1900 pb) com 96 caracteres da morfologia externa de adultos dos 10 gêneros de Ambulycini em uma análise de Inferência Bayesiana. A tribo forma um grupo monofilético, bem como nove de seus gêneros. Nenhuma das sinapomorfias morfológicas de Ambulycini encontradas são características exclusivas, se incluídas espécies de outras subfamílias não investigadas. *Adhemarius* é um gênero polifilético que deve ser revisado. Os quatro gêneros neotropicais estão divididos em duas linhagens e não formam um grupo monofilético. *Orecta* spp., *Trogolegnum pseudambulyx* e *Adhemarius* *senso latu* compõem a linhagem dos ademariformes, caracterizada por quatro sinapomorfias. Ainda, usando-se principalmente a região barcode do gene COI, foram analisadas filogeograficamente algumas populações de *Adhemarius eurysthenes* para a obtenção de informações sobre a estrutura e a variabilidade genética, buscando padrões que possam ser transpostos para estudos de conservação dos Ambulycini na Mata Atlântica. Foram obtidos 14 haplótipos de 109 indivíduos distribuídos em 10 localidades. A localidade do Espírito Santo foi aquela com maior distância genética média para com as demais populações. Concordantemente, o teste de variancia molecular que inclui o componente espacial separou as amostras em dois grupos, onde o Espírito Santo foi a localidade divergente das demais. Em contrapartida, nenhuma correlação foi obtida entre a variação genética

e a distância geográfica. Sendo assim, pode ser observada uma tendência de isolamento genético da população do Espírito Santo em relação às demais. Desse modo, esta passa a ser uma localidade de particular importância para a conservação de espécies de Ambulycini endêmicas da Mata Atlântica, como *A. eurysthenes* e *O. lycidas*. Finalmente, a única sinapomorfia morfológica confiável de Ambulycini, ainda não confirmada para alguns táxons, provém do estágio de pupa, indicando a importância das formas imaturas para a sistemática da tribo. Sendo assim, foram descritos o estágio de ovo e o primeiro ínstar de *O. lycidas* e comparados com o que está disponível na literatura. Este é o primeiro trabalho que descreve a quetotaxia de uma larva de Ambulycini. A maioria dos trabalhos com imaturos de Sphingidae limitam-se à descrição dos padrões de coloração e formato geral do corpo das larvas. Estudos da ultraestrutura dos estágios imaturos de Ambulycini terão um papel importante na incorporação futura de novas informações em estudos sistemáticos da tribo, contribuindo assim para a descoberta de sinapomorfias que dêem maior consistência para a hipótese obtida neste trabalho.

Abstract

The Brazilian hawk moths are still poorly known. *Orecta lycidas* (Sphingidae, Smerinthinae, Ambulycini) has been considered a rare species on account of reduced series of individuals in the entomological collections, even for extensively sampled locations. So far, there is none phylogenetic hypothesis for the relationship of all genera of Ambulycini and thus little is known about the relationship of *O. lycidas* with the geographically closest taxa. One of the Neotropical species more closely related to *O. lycidas*, which shares a very similar geographic distribution, and the same family of host plant of the larvae, is *Adhemarius eurysthenes*. This species is among the most abundant in recent surveys of Sphingidae for Atlantic Forest localities in São Paulo, and can be collected in all months of the year. Therefore, it is possible to achieve, with relatively little effort, satisfactory amounts of individuals for the study of their populations. In this work, the recovered phylogenetic hypothesis combined data of COI genes, CAD and *wingless* (1900 bp) with 96 characters of adult external morphology of the 10 genera of Ambulycini in a Bayesian inference analysis. The tribe is a monophyletic group, as well as nine of their genera. No morphological synapomorphies of Ambulycini found in the present work are exclusive if other subfamilies of Sphingidae are considered. *Adhemarius* is a polyphyletic genus in need of revision. The four Neotropical genera are divided into two lineages and do not form a monophyletic group. *Orecta* spp., *Trogolegnum pseudambulyx* and *Adhemarius sensu lato* comprise the lineage of ademariphorms, characterized by four synapomorphies. Still, mainly using up the COI gene barcode region, some populations of *Adhemarius eurysthenes* were phylogeographically analyzed, to obtain information on the structure and genetic variability, seeking patterns that can be transferred to the Ambulycini conservation studies in the Atlantic Forest. We obtained 14 haplotypes of 109 individuals from 10 localities. The locality of the Espírito Santo was one with the highest average genetic distance among the other populations. Accordingly, the molecular variance test that includes the spatial component separated samples into two groups, and Espírito Santo was divergent from the other localities. However, no correlation was found between genetic variation and geographic distance. Thus, it can be observed genetic isolation trend of the population of the Espírito Santo in relation to the others. Thus, it becomes a place of particular importance for the conservation of endemic species of Ambulycini,

such as *A. eurysthenes* and *O. lycidas*. Finally, the only reliable morphological synapomorphy of Ambulycini, not yet confirmed for some taxa, comes from the pupal stage, indicating the importance of the immature forms for a better understanding of the tribe. Thus, we described the egg stage and the first instar of *O. lycidas* and compared them with what is available in the literature. This is the first report describing the chaetotaxy of an Ambulycini larva. Most work on the immature stages of Sphingidae is limited to the description of the color patterns and general shape of the body of the larvae. Ultrastructure studies of the immature stages of Ambulycini will have an important role in the future development of new information in systematic studies of Ambulycini, thus contributing to the discovery of synapomorphies that could give greater consistency to the hypothesis obtained in this work.

Referências Bibliográficas

- Amorim, D.S., & Oliveira, S.S. 2008. Eleven new species of the genus *Cluzobra* Edwards (Diptera, Mycetophilidae, Sciophilinae) from the Atlantic Forest of Brazil. *Zootaxa* 1920: 1–28.
- Avice, J. C. 2000. **Phylogeography. The history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Avice, J. C. 2001. Cytonuclear genetic signatures of hybridization phenomena: Rationale, utility, and empirical examples from fishes and other aquatic animals. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 253–263.
- Barbosa, P., Kemper, J., Gross, P., & Martinat, P. 1990. Influence of dietary nicotine and colony source of *Manduca sexta* [Lepidoptera: Sphingidae] on its suitability as a host of *Cotesia congregata* [Hymenoptera: Braconidae]. *Entomophaga* 35 (2): 223-231.
- Batalha-Filho, H., & Miyaki, C. T. 2011. Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia, Volume Especial Biogeografia*: 31–34.
- Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. 2006. **Ecology: from individuals to ecosystems**. Oxford: Blackwell Publishing. 4 ed. 752 pp.
- Bell, T. R. D., & Scott, F. B. 1937. **The Fauna of British India, including Ceylon and Burma**. Moths. 5 Sphingidae. Taylor and Francis Ltd, London, xviii + 537 pp., 15 pls, 1 map.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. 2011. GenBank. *Nucleic Acids Research* . doi:10.1093/nar/gkr1202
- Bereczki, J., Pecsénye, K., Peregovits, L., & Varga, Z. 2005. Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43:157-165.
- Boisduval, J. B. A. [1875] 1874. Sphingides, Sesiides, Castnides. In: Boisduval, J. B. A., & Guenée, A. (eds.). **Histoire naturelle des insectes. Species général des Lépidoptères Hétérocères**. Volume 1. Paris: Librairie Encyclopédique de Roret. 568 pp.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304
- Brito, P. H., & Edwards, S. V. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135: 439-55.

- Brower, A. V. Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiidae). *Systematics and Biodiversity* 4: 127-132.
- Brower, A.V. Z., DeSalle, R. 1998. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of *wingless* as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology* 7: 73–82.
- Burmeister, H. C. C. 1878-1880. Description physique de la République Argentine d'après des observations personnel. Jes et étrangères. 5. Lepidopteres. Première partie. Contenant les diurnes, crépusculaires et bombycoïdes. Buenos Aires, P.E. Coni; Paris, F. Savy; Halle, E. Anton., V1+526 pp. (1878); Atlas, IV+64 1879-1880 pp.
- Campbell, D. L., Brower, A. V. Z., & Pierce N. E. 2000. Molecular evolution of the *wingless* gene and its implications for the phylogenetic placement of the butterfly Family Riodinidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Molecular Biology and Evolution* 17: 684-696.
- Carcasson, R. H. 1968. Revised catalogue of the African Sphingidae (Lepidoptera) with descriptions of the East African species. *Journal of the East Africa Natural History and National Museum* 26(3): 1–148, pls. 1–17.
- Carcasson, R. H., & Heppner, J. B. 1996. Sphingoidea, Sphingidae, pp. 50-62 In Heppner, J. B. (Ed.). **Atlas of Neotropical Lepidoptera. Checklist: Part 4B.** Drepanoidea - Bombycoidea - Sphingoidea. Association for Tropical Lepidoptera, Gainesville. 87 pp + 50 pp introd. & bibliography.
- Carlini, D. B., & Wolfgang, S. 2003. In vivo introduction of unpreferred synonymous codons into the Drosophila ADH gene results in reduced levels of ADH protein. *Genetics* 163(1): 239–243.
- Carnaval, A. C.; Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- Cates, R. G. 1981. Host Plant Predictability and the Feeding Patterns of Monophagous, Oligophagous, and Polyphagous Insect Herbivores. *Oecologia (Berl)* 48: 319-326.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A.. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- DaSilva, M. B., & Pinto-da-Rocha, R. 2011. História biogeográfica da Mata Atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: Carvalho, C. J. B. de;

- Almeida, E. A. B. (Org.). **Biogeografia da América do Sul - Padrões e Processos**. São Paulo: Roca: 221-238.
- De Freina, J. J., & Geck, M. 2003. Studien zur Ökologie, Biologie, Verbreitung und Geographischen Variabilität von *Akbesia davidi* (Oberthur, 1884) (Lepidoptera: Sphingidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* 23: 167-180.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 360: 1905–1916.
- Di Bitetti, M. S., Placci, G., & Dietz, L. A. 2003. **Uma visão de Biodiversidade para a Ecorregião Florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação**. Washington, D.C.: World Wildlife Fund. 153 pp.
- Diaz, S. D. R. 2014. Catálogo de los Sphingidae (Insecta: Lepidoptera) depositados en el Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay* 18(1): 111–124.
- Diez-Rodríguez, G. I., & Omoto, C. 2001. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. *Neotropical Entomology* 30(2): 311-316.
- Dow, J.A.T., Gupta, B. L., Hall, T. A., & Harvey, W. R. 1984. X-ray Microanalysis of Elements in Frozen-Hydrated Sections of an Electrogenic K⁺ Transport System: The Posterior Midgut of Tobacco Hornworm (*Manduca sexta*) *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Membrane Biology* 77: 223-241.
- Downey, J. C., & Allyn, A. C. 1981. Chorionic sculpturing in eggs of Lycaenidae. Part I. *Bulletin of the Allyn Museum* 61: 1–29.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: doi:10.1186/1471-2148-1187-1214.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- Duarte, M., Carlin, L. F. & Marconato, G. 2008. Light attracted hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae) of Boraceia, municipality of Salesópolis, state of São Paulo, Brazil. *Checklist* 4(2): 123-136.
- Duarte, M., Robbins, R. K., & Mielke, O. H. H. 2005. Immature stages of *Calycopis caulonia* (Hewitson, 1877) (Lepidoptera, Lycaenidae, Theclinae, Eumaeini), with notes on rearing detritivorous hairstreaks on artificial diet. *Zootaxa* 1063: 1–31.

- Duarte, M., Specht, A., Marconato, G., & Casagrande, M. M. 2012. Lepidoptera, pp. 625-682. In: Rafael, J. A.; G. A. R. Melo; C. J. B. Carvalho; S. A. Casari & R. Constantino (Eds.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Holos Editora. Ribeirão Preto. 796 pp.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Eaton, J. L. (ed.) 1988. **Lepidoptera Anatomy**. New York. Wiley-Interscience Publication. 257 pp.
- Ehrlich, P. R., & Ehrlich, A. H. 1961. **How to know the butterflies**. Dubuque, Wm. C. Brown Company Publishers, VIII + 266 pp.
- Eitschberger, U., & Ihle, T. 2008. Raupen von Schwärmern aus Laos und Thailand - 1. Beitrag (Lepidoptera, Sphingidae). *Neue Entomologische Nachrichten* 61: 101-114.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Farris, J. S. 1969. A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology* 18: 374-385.
- Feinstein, J. 2004. DNA sequence from butterfly frass and exuviae. *Conservation Genetics* 5: 103-104.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Fraser, A. M., Mechaber, W. L., & Hildebrand, J. G. 2003. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 29 (8): 1813-1832.
- Freeland, J. R. 2006. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England. 388 pp.

- Freitas, A.V. L., & Brown Jr., K. S. 2004. Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Systematic Biology* 53(3): 363-383.
- Galindo-Leal, C., & Câmara, I. G. 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. [pp. 3-11]. In: Galindo-Leal, C., & Câmara, I. G. (Eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica — Belo Horizonte: Conservação Internacional. 472 pp.
- Gaston, K. J. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* 5: 283–296.
- Givnish, T. J., & Systma, K. J. 1997. Homoplasy in molecular vs. morphological data: the likelihood of correct phylogenetic inference. In: Givnish & Sytsma, T. J., K. J. (Eds.). **Molecular Evolution and Adaptive Radiation**. Cambridge University Press, New York. 638 pp.
- Goldsmith, M. R., & Marec, F., (Eds.). 2010. **Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera**. Boca Raton: CRC Press. 362 pp.
- Goloboff, P. A. 1993. NONA v. 2.0: A Tree Searching Program. Programa e documentação. Publicado pelo autor. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod>.
- Goloboff, P., Farris, J., & Nixon, K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Grimaldi, D., & Engel, M. S. 2005. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, xv + 755 pp.
- Hare, M. P. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 700–706.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 596-599.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., Francis, C. M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol* 2: 1657-1663.
- Heirich, C. 1916. On the taxonomic value of some larval characters in the Lepidoptera. *Proceedings of the entomological society of Washington* 18: 154-164.

- Hennig, W. 1966. **Phylogenetic systematics**. Illinois University Press. Urbana. 286 pp.
- Heppner, J. B. 1991. Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. *Tropical Lepidoptera* 2(suppl.1): 1-85.
- Heppner, J. B. 1998. Classification of Lepidoptera. Part 1. Introduction. *Holarctic Lepidoptera* 5(suppl.1): 1-148.
- Heppner, J. B. 2008. Florida Lepidoptera notes, 3. *Protambulyx* hawk moths in Florida (Lepidoptera: Sphingidae). *Lepidoptera Novae* 1: 90-94
- Hinton, H. E. 1946. On the homology and nomenclature of the setae of lepidopterous larvae, with some notes on the phylogeny of the Lepidoptera. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 97: 1-37.
- Hodges, R. W. 1971. Sphingoidea (Hawkmoths). In: Dominick *et al.* (Eds.): **The moths of America North of Mexico**. Fasc. 21. 158 + xii pp., 14 pls. London.
- Inoue, H. 1982. 65. Sphingidae. [pp. 590-604], In: Inoue, H., Sugi, S., Kuroko, H., Moriuti, S., & Kawabe, A. (Eds), **Moths of Japan**, vol. 1. Text. Kodansha, Tokyo. 552 pp.
- Inoue, H., Kennett, R. D., & Kitching, I. J. [1996] 1997. Sphingidae. In: Pinratana, A. (Ed) **Moths of Thailand**, vol. 2. Chok Chai Press. Bangkok. 149 pp.
- Janse, A. J. T. 1932. **The moths of South Africa**. Durban: E. P. & Commercial Printing.
- Janzen, D. H. & Hallwachs, W. 2000. Philosophy, navigation and use of a dynamic database ('ACG Caterpillars SRNP') for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of the Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica. <http://janzen.sas.upenn.edu>.
- Janzen, D. H. 1984. Two ways to be a tropical big moth: Santa Rosa saturniids and sphingids. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 1: 85-140.
- Johnson, B. J., Scott, M. P., & Adams, B. J. 2009. Where's the ecology in molecular ecology? *Oikos* 118: 1601-1609.
- Kawahara, A. Y., Mignault, A. A., Regier, J. C., Kitching, I. J., & Mitter, C. 2009. Phylogeny and biogeography of hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): evidence from five nuclear genes. *PLoS ONE* 4: e5719.
- Kawahara, A. Y. 2007. **Molecular phylogenetic analysis of the hawkmoths (Lepidoptera: Bombycoidea: Sphingidae) and the evolution of the sphingid proboscis**. Masters Thesis. University of Maryland, College Park. 144 pp.

- Kawahara, A. Y., & Breinholt, J. W. 2014. Phylogenomics provides strong evidence for relationships of butterflies and moths. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 281: 20140970.
- Kirk, H., Dorn, S., Mazzi, D. 2013. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. *BMC Ecology* 13: 12. 10.1186/1472-6785-13-12.
- Kitching, I. J., Forey, P. L., Humphries, C. J., Williams, D. 1998. **Cladistics - Theory and Practice of Parsimony Analysis**. 2nd Edition. Oxford Press. 228 pp.
- Kitching, I. J. & Cadiou, J. M. 2000. **Hawkmoths of the world: an annotated and illustrated revisionary checklist (Lepidoptera: Sphingidae)**. Cornell University Press, Ithaca. 226 pp.
- Kitching, I. J. 2002. The phylogenetic relationships of Morgan's Sphinx, *Xanthopan morgani* (Walker), the tribe Acherontiini, and allied long-tongued hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae, Sphinginae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 135: 471-527.
- Kitching, I. J. 2003. Phylogeny of the death's head hawkmoths, *Acherontia* [Laspeyres], and related genera (Lepidoptera: Sphingidae: Sphinginae: Acherontiini). *Systematic Entomology* 28: 71-88.
- Kitching, I. J. 2015. Sphingidae Taxonomic Inventory, <http://sphingidae.myspecies.info/>, acessado em 11 de março de 2015.
- Kitching, I. J.; Ledezma, J.; Baixeras, J. 2001. The Sphingidae of Bolivia (Insecta: Lepidoptera). Concepción. *Gayana (Concepc.)* 65(2): 79-111. Disponível em <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071765382001000200001&lng=es&nrm=iso>.
- Klots, A. 1970. Lepidoptera. In: Tuxen, S. L. (ed.) **Taxonomist's glossary of genitalia in insects**. Munksgaard. Copenhagen. 359 pp.
- Kraushaar, U., Goudet, J., & Blanckenhorn, W. U. 2002. Geographical and altitudinal population genetic structure of two dung fly species with contrasting mobility and temperature preference. *Heredity* 89: 99-106.
- Kristensen, N. P. 1981. Phylogeny of Insect Orders. *Annual Review of Entomology* 26: 135-57
- Kristensen, N. P. 1998. Band/ Vol.IV Arthropoda: Insecta. Lepidoptera, moths and butterflies: evolution, systematics, and biogeography. Vol. 1. In: Fischer, M. (Ed.). **Handbuch der Zoologie. Handbook of Zoology**. Berlin, Walter de Gruyter. 491 pp.
- Kristensen, N. P., & Skalski, A. W. 1998. Phylogeny and palaeontology. (pp. 7-25). In: Kristensen, N. P. (Ed.). **Band/ Volume IV Arthropoda: Insecta. Lepidoptera,**

- moths and butterflies: evolution, systematics, and biogeography.** Vol.1. *In:* Fischer, M. (Ed.). **Handbuch der Zoologie. Handbook of Zoology.** Berlin, Walter de Gruyter. 491 pp.
- Kristensen, N. P., Scoble, M. J., & Karsholt, O. 2007. Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa* 1668: 699–747.
- Kritsky, G. 2001. Darwin's Madagascan hawk moth prediction. *American Entomologist* 37: 206-210.
- Lemaire, C., & Minet, J. 1998. The Bombycoidea and their relatives. (pp. 321-353) *In:* Kristensen, N. P. (Ed.), Band/Volume IV. **Arthropoda: Insecta. Lepidoptera, moths and butterflies: evolution, systematics, and biogeography.** Vol. 1. *In:* Fisher, M. (Ed.). **Handbuch der Zoologie/Handbook of Zoology.** Berlin, Walter de Gruyter.
- Lemaire, C.; & Minet, J. 1998. The Bombycoidea and their relatives. *In:* Kristensen, N. P. (Ed.). **Lepidoptera, Moths and Butterflies vol. 1: Evolution, Systematics and Biogeography.** Berlin: Walter de Gruyter. 491 pp.
- Lin, C. S. 2000. Larval morphology and life history of three sphingid moths (Lepidoptera: Sphingidae) of Taiwan. *Chinese Journal of Entomology* 20: 89-95.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>. (725 modules)
- Mallet, J. 2006. Species concepts. [pp. 367-373]. *In:* Fox C. W. (Ed.). **Evolutionary Genetics. Concepts and Case Studies.** Oxford. Oxford University Press.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mattoni, R., & Penco, F. 2012. **Big moths of Buenos Aires and southern Uruguay.** The Lepidoptera Research Foundation. Califórnia. 34 pp.
- Matyot, P. 2005. The hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae) of Seychelles : identification , historical background , distribution , food plants and ecological considerations. *Phelsuma* 13(1): 55–80.
- McCormack, J. E., Huang, H., & Knowles, L. L. 2009. Maximum likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic Biology* 58: 501-508.
- Mell, 1922. Neue südchinesische Lepidoptera. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*: 113-129.

- Mielke, C. G. C., & Haxaire, J. 2013. A Hawk Moths fauna of southern Maranhão state, Brazil, with description of a new species of *Orecta* Rothschild & Jordan, 1903 and the female of *Nyceryx mielkei* Haxaire, 2009 (Lepidoptera: Sphingidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* 34 (3): 109-116.
- Miller, J. C., Janzen, D. G., & Hallwachs, W. 2006. **100 caterpillars: portraits from the tropical forests of Costa Rica**. Cambridge, Mass.: Belknap Press of Harvard University Press. 264 pp.
- Minet, J. 1994. The Bombycoidea: phylogeny and higher classification (Lepidoptera: Glossata). *Entomologica Scandinavica* 25(1): 63-88.
- Mitchell, A., Cho, S., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., & Matthews, M. 1997. Phylogenetic utility of Elongation Factor-1 alpha in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): The limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution* 14(4): 381-390.
- Moré, M., Kitching, I. J. & Cocucci, A. A. 2005. **Sphingidae: Esfingídeos de Argentina. Hawkmoths of Argentina**. Buenos Aires: L.O.L.A. (Literature of Latin America). 184 pp.
- Moss, A. M. 1920. Sphingidae of Para, Brazil. Early stages, food-plants, habits, etc. *Novitates Zoologicae* 27: 333-424.
- Müller, G. C., Kravchenko, V., Li, C., Eitschberger, U., Hausmann, A., Miller, M. A., Orlova, O., Speidel, W., & Witt, T. 2005. The Hawk Moths (Lepidoptera: Sphingidae) of Israel: Distribution, Phenology and Ecology. *Atalanta* 36 (1/2): 222-237.
- Nakamura, M. 1976. An inference on the phylogeny of Sphingidae in relation to habits and the structures of their immature stages. *Yugatô* 63: 19-28.
- Nakamura, M. 1977. Supplement to the pupae of Japanese Sphingidae (Lepidoptera). *New Entomologist* 26: 1-13.
- Nakamura, M. 1978. The “cell length ratio” of the wing in Sphingidae, and its application to the classification. *Yugatô* 74: 111-116.
- Nei, M. & Kumar, S.. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Nieukerken, E. J. V., Kaila, L., Kitching, I. J., Kristensen, N. P., Lees D. C., *et al.* 2011. Order Lepidoptera. *Zootaxa* 3148: 212-221
- Nijhout, H. J. 1991. **The development and evolution of butterfly wing patterns**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. xvi, 297 pp.
- Nixon, C. K. & Carpenter, J. M. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.

- Oehlke, B., 2000. **Sphingidae of the Americas**.
<http://www.silkmoths.bizland.com/aeurysth.htm>.
- Oliveira, R. B. de; Specht, A. & Corseuil, E. 1999. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. *Biociências* 7 (1): 167-177.
- Paprocki, H. 2012. Trichoptera, pp. 614-623. *In*: Rafael, J. A.; G. A. R. Melo; C. J. B. Carvalho; S. A. Casari & R. Constantino (Eds.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Holos Editora. Ribeirão Preto. 796 pp.
- Pecsénye, K., Bereczki, J., Tihanyi, B., Toth, A., Peregovits, L., & Varga, Z. 2007. Genetic differentiation among the *Maculinea* species (Lepidoptera : Lycaenidae) in eastern Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 11-21.
- Peña, C., Wahlberg, N., Weingartner, E., Kodandaramaiah, U., Nylin, S., Freitas, A. V. L., & Brower, A. V. Z. 2006. Higher level phylogeny of Satyrinae butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40(1): 29-49.
- Peterson, A. 1962. **Larvae of insects. An introduction to Nearctic species. Part I.** Lepidoptera and plant infesting Hymenoptera. Ann Arbor, Edwards Brothers. 315 pp.
- Pinhey, E. C. G., 1962. **Hawk Moths of Central and Southern Africa**. Longmans. Salisbury. 139 pp.
- Pinto-Da-Rocha, R.; Bragagnolo C. & Da-Silva, M. B. 2005. Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Arachnology* 33(2): 290-299.
- Pittaway, A. R. 1997-2015. **Sphingidae of the Western Palaearctic**.
<http://tpittaway.tripod.com/sphinx/list.htm>.
- Pittaway, A. R., & Kitching, I. J. 2000-2015. **Sphingidae of the Eastern Palaearctic**.
<http://tpittaway.tripod.com/china/china.htm>.
- Puillandre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddam, J. L., Capdevielle-Dulac, C., *et al.* 2008. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* 10: 319–333.
- Rafael, J. A.; G. A. R. Melo; C. J. B. Carvalho; S. A. Casari & R. Constantino (Eds.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Holos Editora. Ribeirão Preto. 796 pp.

- Raguso, R. A., Light, D. M., & Pickersky, E. 1996. Electroantennogram responses of *Hyles lineata* (Sphingidae: Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers. *Journal of Chemical Ecology* 22(10): 1735-1776.
- Rambaldi, D. M., & Oliveira, D. A. S. 2003. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Regier, J. C., Mitter, C., Friedlander, T. P., & Peigler, R. S. 2001. Phylogenetic relationships and evolution of hostplant use in Sphingidae (Lepidoptera): initial evidence from two nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 311–316.
- Regier, J. C., Cook, C. P., Mitter, C. & Hussey, A. 2008a. A phylogenetic study of the ‘bombycoid complex’ (Lepidoptera) using five protein-coding nuclear genes, with comments on the problem of macrolepidopteran phylogeny *Systematic Entomology* 33: 175–189.
- Regier, J. C., Grant, M. C., Mitter, C., Cook, C. P., Peigler, R. S., *et al.* 2008b. Phylogenetic relationships of wild silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae) inferred from four protein-coding nuclear genes. *Systematic Entomology* 33: 219–228.
- Riddle, B. R., Ladle, R. J., Lourie, S. A., & Whittaker, R. J. 2011. Basic biogeography: estimating biodiversity and mapping nature. [pp. 47–92]. *In*: Ladle, R. J., Whittaker, R. J., (Eds). **Conservation Biogeography**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Robinson, G. S., Ackery, P. R., Kitching, I. J., Beccaloni, G. W., & Hernández, L. M., 2009. HOSTS—A Database of the World’s Lepidopteran Hostplants. Natural History Museum, London. <http://www.nhm.ac.uk/researchcuration/research/projects/hostplants/> (Acesso em 2015)
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Huelsenbeck, J. P., *et al.* 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology* . doi:10.1093/sysbio/sys029
- Rothschild, W., & Jordan, K. 1903. A revision of the lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae* 9, i–cxxv: 1-813.
- Scaramuzza, C. A. M., Simões, L. L., Rodrigues, S. T., Accacio, G. M., Hercowitz, M., Rosa, M. R., Goulart, W., Pinagé, E. R., & Soares, M. S. 2011. **Visão da**

- biodiversidade da ecorregião Serra do Mar.** Brasília-DF: WWF-Brasil. 167 pp.
- Schreiber, H. 1978. Dispersal centres of Sphingidae (Lepidoptera) in the Neotropical Region. *In*: Schmithüsen, J. (Ed.). **Biogeographica**. Boston: Junk. 195 pp.
- Seraphim, N., Marín, M. A., Freitas, A. V. L., & Silva-Brandão, K. L. 2014. Morphological and molecular marker contributions to disentangling the cryptic *Hermeuptychia hermes* species complex (Nymphalidae: Satyrinae: Euptychiina). *Molecular Ecology Resources* 14(1): 39-49.
- Sereno, P. C. 2007. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23: 565–587.
- Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology*. 51: 492–508.
- Sibatani, A., Ogata, M., Okada Y. & Okagaki R. 1954. Male genitalia of Lepidoptera: morphology and nomenclature. 1. Divisions of the valvae in Rhopalocera, Phalaenidae (Noctuidae) and Geometridae. *Annals of the Entomological Society of America* 47: 93-106.
- Silva-Brandão, K. L., Freitas, A. V. L., Brower, A. V. Z., & Solferini, V. N. 2005. Phylogenetic relationships of the New World Troidini swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) based on COI, COII, and EF-1 alpha genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 468-483.
- Silva-Brandão, K. L., Lyra, M. L., & Freitas, A. V. L. 2009. Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical Entomology* 38: 441-451.
- Silva-Brandão, K. L., Wahlberg, N., Francini, R. B., Azeredo-Espin, A. M. L., Brown Jr., K. S., Paluch, M., Lees, D. C., Freitas, A. V. L. 2008. Phylogenetic relationships of butterflies of the tribe Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) and the evolution of host plant use. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 515–531.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Stehr, F. W. 1987. Order Lepidoptera, p.288-596. *In*: Stehr, F. W. (Ed.). **Immature Insects**, vol. 2. Kendal/Hunt publishing company, Dubuque, Iowa. 754 pp.
- Tabarelli, M., Mantovani, W., & Peres, C. A. 1999. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. *Biological Conservation* 91: 119–127.

- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. 1992. A cladistics analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Tourinho-Davis, A. L. M. 2004. The third South American species of *Pectenobunus* Roewer, with a new synonym for the genus (Opiliones, Eupnoi, Sclerosomatidae, Gagrellinae). *Zootaxa* 405: 1-16.
- Tourinho-Davis, A. L. M., & Kury, A. B. 2003. A Review of *Jussara* Mello-Leitão, 1935, with description of six more species from Brazil (Arachnida, Opiliones, Sclerosomatidae). *Tropical Zoology* 16(2): 1-65.
- Trautwein, M. D., Wiegmann, B. M., Beutel, R., Kjer, K. M., & Yeates, D. K.. 2012. Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annual Review of Entomology* 57: 449-68.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <<http://www.tropicos.org/Name/42000058>> (Acesso em 12/02/2015).
- Tuttle, J. P. 2007. **The hawk moths of North America**. The Wedge Entomological Research Foundation. Washington, DC. 253 pp.
- Tyler, H., Brown, K. S. J., & Wilson, K. 1994. **Swallowtail butterflies of the Americas. A study in biological dynamics, ecological diversity, biosystematics and conservation**. Scientific Publishers, Gainesville. 376 pp.
- Vogler, A. P., & Monaghan, M. T. 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 1-10.
- Wahlberg, N., & Wheat, C. W. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* 57: 231-242.

- Wahlberg, N., Wheat, C. W., & Peña, C. 2013: Timing and patterns in the taxonomic diversification of Lepidoptera (butterflies and moths). *PLoS ONE* 8(11): e80875. doi:10.1371/journal.pone.0080875
- Wang, L. Y. 1990. On five species of walnut hornworms and their immature stages. *Sinozoologia* (7): 175-180.
- Won, Y. J., Hallam, S. J., O'Mullan, G. D. & Vrijenhoek, R. C. 2003. Cytonuclear disequilibrium in a hybrid zone involving deep-sea hydrothermal vent mussels of the genus *Bathymodiolus*. Blackwell. *Molecular Ecology* 12: 3185-90.
- Yang, X. M., Sun, J. T., Xue, X. F., Li, J. B., Hong, X. Y. 2012. Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. *PLoS ONE* 8: e34567.
- Zheng, Y., Peng, X., Liu, G., Pan, H., Dorn, S., *et al.* 2013. High Genetic Diversity and Structured Populations of the Oriental Fruit Moth in Its Range of Origin. *PLoS ONE* 8 (11): e78476. doi:10.1371/journal.pone.0078476.
- Zhou, T., Ko, E. A., Gu W., Lim, I., Bang, H., *et al.* 2012. Non-Silent Story on Synonymous Sites in Voltage-Gated Ion Channel Genes. *PLoS ONE* 7(10): e48541. doi:10.1371/journal.pone.0048541.
- Zikàn, J. F. 1928. Zur Biologie von *Orecta lycidas* Boisd. und *Chlaenogramma muscosa* Jones. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina* 2: 95-98.
- Zwick, A. 2008. Molecular phylogeny of Anthelidae and other bombycoid taxa (Lepidoptera: Bombycoidea). *Systematic Entomology*: 190–209.
- Zwick, A., Regier, J. C., Mitter, C., & Cummings, M. P. 2011. Increased gene sampling yields robust support for higher-level clades within Bombycoidea (Lepidoptera). *Systematic Entomology* 36: 31–43.

Material Suplementar

Figura S1. Árvore de Inferência Bayesiana dos três marcadores moleculares combinados.

Figura S2. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene COI. Valores abaixo de cada nó indicam o bootstrap padrão calculado. Foram mantidos apenas os valores acima de 50%, exceto aqueles obtidos para nós entre os terminais de *Orecta lycidas*. O melhor modelo obtido para este conjunto de dados foi T92+G+I. Triângulos pretos representam ramos colapsados.

Figura S3. Árvore de COI obtida pelo método de Máxima Verossimilhança, sem as sequências do grupo externo. Valores de bootstrap próximo aos ramos.

Figura S4. Árvore de Máxima Verossimilhança de todas as sequências disponíveis para o gene CAD. Grupos de indivíduos de uma mesma espécie foram colapsados. Valores de bootstrap próximos de cada nó. Triângulos pretos representam ramos colapsados.

Figura S5. Árvore de *wingless* obtida pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo T92 e o parâmetro de sítios invariáveis. Valores indicam o bootstrap padrão. Triângulos pretos representam ramos colapsados.