

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Análise da coloração das asas no contexto sexual
em um par mimético de borboletas *Heliconius***

André Luis Klein

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular
para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, março de 2011

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este estudo foi realizado nas seguintes instituições:

- Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Brasil.

- Laboratório de Laser e Ótica, Departamento de Física, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Brasil.

- Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Brasil.

Fonte financiadora:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho à memória do meu avô Ivo Drecksler, que sabia da natureza coisas que não se aprende na faculdade.

AGRADECIMENTOS

Sou grato ao Aldo, meu orientador, pelo incentivo a sempre explorar novos temas e pela confiança que deposita em seus alunos, estimulando a iniciativa e o pensamento autônomo. Aos colegas de laboratório, pelos momentos de descontração; principalmente à Ana e à Janaína, que ouvem minhas bobagens todos os dias e ainda me dão chocolates, barras de cereais, biscoitos, balas, etc. Sem toda esta glicose meu cérebro teria trabalhado mais lentamente. A Mariana, o Pedro e o Marcelo também foram ótimas companhias de trabalho, almoços, prosas, cafés e rodadas de chimarrão. Obrigado a todos pela vivência diária no laboratório.

Agradeço ao professor Olaf Mielke, por me receber de forma tão amigável durante minha visita à UFPR, e aos professores Flavio Horowitz e Marcelo Pereira, por abrirem as portas de seu laboratório e aceitarem iniciar uma colaboração fundamental neste trabalho. Os alunos do Laboratório de Lepidoptera Neotropical também me receberam muito bem e me auxiliaram no que foi preciso; da mesma forma que os alunos do Laboratório de Laser e Ótica. Não tenho o nome de cada um deles, mas sou muito grato.

Agradeço ao Ernesto que, mesmo distante, em curtas visitas contribuiu significativamente com sugestões e comentários para a apresentação deste trabalho.

Alguns curiosos me acompanharam como auxiliares de campo nas trilhas de Paula Freitas, no Paraná, à procura de borboletas. Obrigado Renan, Juninho, Walter e Régis.

Agradeço, por fim, aos que me são mais queridos: meus pais, Ivo e Soeli, por compreenderem a brevidade das minhas visitas e por incentivarem meu trabalho e meus estudos; e minha namorada, Gaia, por todo o carinho e a alegria que compartilhamos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
CAPÍTULO 1 – Função sexual e caracterização comparada das cores de um padrão mimético em borboletas <i>Heliconius</i>	12
CAPÍTULO 2 – Variação de tamanho nos elementos da coloração das asas de duas borboletas miméticas e o papel possível da seleção sexual.....	36
DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Este estudo investiga a coloração das asas de duas borboletas miméticas – *Heliconius erato phyllis* e *H. besckei* – como sinais sexuais. Para saber se dois elementos do padrão de cores possuem função como sinais de reconhecimento de parceiros na primeira espécie foram feitos experimentos comportamentais com modelos de fêmeas. Tanto a mancha vermelha quanto a barra amarela se revelaram igualmente importantes para atrair os machos e disparar o início do cortejo. Se os mesmos sinais envolvidos no mimetismo são usados no contexto sexual, a possibilidade de um conflito de funções e de interferência reprodutiva entre estas espécies é reforçada. A fim de verificar se existe alguma diferença na natureza da coloração entre as duas espécies, quatro regiões das asas foram analisadas por espectrofotometria. A principal diferença foi um pico de ultravioleta marcante em *H. erato*, mas quase ausente em *H. besckei*; um possível mecanismo de discriminação específica que amenizaria os custos da multifuncionalidade. A terceira abordagem do estudo tratou de verificar se existe alguma diferença de tamanho dos elementos da coloração entre os sexos de cada espécie. Encontramos que três desses elementos são maiores nos machos em ambas as espécies, mas o que não possui diferença não é o mesmo. Também verificamos que os elementos da face dorsal têm seu tamanho fortemente correlacionado com os da face ventral. Estes padrões de variação podem ser resultado de um processo de seleção sexual epigâmica e de restrições evolutivas relacionadas a outras funções (defesa e termorregulação) ou ao desenvolvimento. Os resultados deste estudo são discutidos no contexto ecológico-evolutivo das espécies em questão, principalmente no que diz respeito ao reforço do isolamento reprodutivo e às pressões seletivas que atuam sobre seu padrão de coloração.

ABSTRACT

This study investigates the wing coloration of two mimetic butterflies – *Heliconius erato phyllis* and *H. besckei* – as sexual signals. To know if two elements of the color pattern have function as mate recognition signals in the first species, behavioral experiments were done with female models. Both the red patch and the yellow bar were proved to be important to attract the males and release the courtship beginning. If the same signals involved in the mimicry are used in the sexual context, the possibility of a conflict of functions and reproductive interference between these species is reinforced. To verify whether there was some difference in the nature of the coloration between the two species, four wing regions were analyzed by spectrophotometry. The main difference was a marked peak of ultraviolet in *H. erato* almost nonexistent in *H. besckei*; a possible mechanism of specific discrimination which would mitigate the costs of multifunctionality. The third approach of the study attempted to verify if there was some difference in the size of the coloration elements between the sexes of each species. We found that three of these elements are bigger in the males in both of them, but the one which doesn't have difference is not the same. We also observed that the elements of the dorsal face have its size strongly correlated with the ventral face ones. These variation patterns can be result of an epigamic sexual selection process and of evolutionary constraints related to other functions (defense and thermoregulation) or to development. The results of this study are discussed in the ecological-evolutionary context of the species in question, particularly with regard to the reinforcement of reproductive isolation and to the selective pressures that act on its coloration pattern.

INTRODUÇÃO

Adaptações e multifuncionalidade

Adaptações biológicas não são perfeitas e isto se deve basicamente a cinco motivos: tempo evolutivo insuficiente, restrições genéticas, restrições do desenvolvimento, restrições históricas e diferentes funções. Estes fatores são conhecidos como *constraints* ou restrições evolutivas. Freeman e Herron (2001) definem *constraint* como "qualquer fator que tenda a diminuir a taxa da evolução adaptativa ou impedir uma população de evoluir o valor ótimo de uma característica". Sobre a última causa, as diferentes funções, Ridley (2004) observa que "as adaptações dos organismos são um conjunto de intercâmbios entre funções múltiplas, atividades múltiplas e as possibilidades no presente e no futuro". Assim, características ecologicamente importantes normalmente são moldadas por várias pressões seletivas diferentes e às vezes mesmo contrárias, de modo que quando estudadas para apenas uma função elas podem parecer mal-projetadas.

O que os sinais sexuais têm de especial?

Wallace (1889) já chamava a atenção para os traços que permitem aos indivíduos reconhecerem seus parceiros e como isto evitaria o risco de se gerar descendentes híbridos inférteis. Ele também sugeriu que a necessidade de reconhecimento específico poderia explicar a incrível diversidade de formas e cores observada em aves e insetos. De fato, o isolamento reprodutivo comportamental (ou sexual) é visto hoje como o mais importante dentre os mecanismos de isolamento em animais (Brown 1975 e Mayr 1977).

As características usadas no reconhecimento específico, contudo, constituem um subgrupo daquelas usadas na escolha de um parceiro adequado para a reprodução. Assim, há uma ligação entre os processos microevolutivos de seleção sexual e os macroevolutivos de especiação (Danchin e Cézilli 2008), tanto que ambos podem tratados como um problema unificado de comunicação animal (Ryan e Rand 1993). Do mesmo modo que a seleção sexual pode dar início ao isolamento de populações, o oposto é verdadeiro – critérios de reconhecimento específico podem direcionar as preferências das fêmeas (Ryan 1998).

Um caso particular da inter-relação entre especiação e sinais sexuais se dá quando duas espécies estreitamente relacionadas ocorrem em simpatria e a divergência entre seus sinais de reconhecimento aumenta, o que acaba por gerar diferenças intraespecíficas com outra população que seja alopátrica e não tenha sofrido esse efeito. Este processo é denominado *deslocamento de caracteres reprodutivos* e pode levar a um processo rápido de especiação, já que a seleção age diretamente nos traços ligados ao isolamento sexual, sem a necessidade de adaptação ecológica (Hoskin e Higgie 2010).

As cores das borboletas

As cores possuem pelo menos três funções bem conhecidas em borboletas: termorregulação, defesa e sinalização sexual (Scoble 1992). Ao mesmo tempo em que as duas últimas se assemelham por serem formas de comunicação – inter e intraespecífica, respectivamente – são justamente as que mais se opõem em outros aspectos. Na coloração críptica a proteção se dá por um padrão difícil de ser distinguido do substrato. No aposematismo os indivíduos possuem cores vistosas e contrastantes que alertam e ensinam

os predadores sobre sua impalatibilidade (outro mecanismo de defesa). Associado ao aposematismo existe o mimetismo, onde espécies palatáveis (mimetismo Batesiano) ou impalatáveis (mimetismo Mülleriano) convergem para o mesmo padrão de coloração (Bates 1862; Muller 1879). Assim, podemos dizer que a seleção natural para defesa tende a dificultar a detecção (coloração críptica) ou confundir a identificação (mimetismo) dos indivíduos portadores da coloração. A seleção para a sinalização sexual, por outro lado, tende a aumentar a eficiência do reconhecimento de parceiros, gerando padrões com alta razão sinal/ruído e exclusividade com respeito à espécie (Silberglied 1984, Vane-Wright e Boppré 1993). Existe, portanto, um conflito em potencial entre estas duas funções – indivíduos crípticos precisam ser vistos por seus coespecíficos e os miméticos precisam ser distinguidos de seus heteroespecíficos. Este conflito em potencial se torna ainda mais grave quando as espécies miméticas são filogeneticamente próximas, já que estas muitas vezes também compartilham padrões comportamentais e de utilização de recursos (Vane-Wright e Boppré 1993).

O cenário ecológico-evolutivo de *Heliconius*

As borboletas do gênero *Heliconius* (Nymphalidae, Heliconiinae) se apresentam como um excelente modelo de estudo nos temas tratados acima. As espécies exibem uma série de subespécies geográficas que, em simpatria, convergiram no padrão de coloração assim como no hábitat (Brown 1979 e Turner 1981); as cores das asas são usadas no reconhecimento de parceiros (Crane 1955, Jiggins *et al.* 2001 e Mavárez *et al.* 2006); as preferências sexuais dos machos coevoluíram com mudanças dos padrões de coloração miméticos (Jiggins *et al.* 2004), provavelmente facilitado por uma forte associação genética

entre estes traços (Kronforst *et al.* 2006), de modo que um passo crucial da especiação neste grupo parece ser a divergência no padrão de cores das asas (McMillan *et al.* 1997, Jiggins *et al.* 2001, Jiggins *et al.* 2004, Mavárez *et al.* 2006 e Giraldo *et al.* 2008); além disso, no sistema de *cruzamento pupal*, característica monofilética compartilhada por algumas espécies do gênero (Beltrán *et al.* 2007), a comunicação química deve ter evoluído de modo particular e se tornado fundamental na localização de fêmeas pelos machos (Deinert 2003; Estrada *et al.* 2009). Observa-se, inclusive, o padrão intrigante de que o mimetismo intragenérico é frequentemente encontrado entre espécies de clados diferentes, normalmente envolvendo uma com cruzamento pupal e outra sem (Gilbert 1991).

Heliconius erato phyllis e *H. besckei* são mímicos que ocorrem em simpatria em populações do sul e sudeste do Brasil (às vezes também com *H. melpomene*) e apenas a primeira pertence ao clado do cruzamento pupal. É relevante mencionar que *H. besckei* está dentre as espécies menos estudadas do gênero, pouco se conhecendo sobre aspectos básicos de sua biologia. Com relação às interações entre as duas espécies, Emsley (1970), em uma comunicação breve, relata que *H. besckei* parece ser atraída por *H. erato phyllis*, com a qual inicia perseguições em vôo, mas não por *H. melpomene melpomene*. Esta, ao contrário das duas primeiras, não possui a faixa amarela nas asas posteriores. Baseado nestas observações, o autor sugere que o amarelo das asas seja o sinal disparador do cortejo mais importante para *H. besckei*, ao passo que para *H. erato phyllis* seria o vermelho, como demonstrado por Crane (1955) em *H. erato hydara*.

Objetivo geral

Tendo em vista as considerações anteriores, estabeleceu-se como objetivo geral do presente estudo:

- Investigar a coloração das asas de duas borboletas miméticas sob a perspectiva do conflito de funções, da seleção natural para isolamento reprodutivo e da seleção sexual.

Este objetivo foi estruturado nas seguintes perguntas:

1. As cores das asas de *Heliconius erato phyllis*, envolvidas no mimetismo com *H. besckei*, possuem função sexual?

(Abordagem comportamental; primeiro artigo).

2. Existe alguma diferença na natureza da coloração das asas entre *Heliconius erato phyllis* e *H. besckei*?

(Abordagem física/qualitativa; primeiro artigo).

3. Existe alguma diferença no tamanho dos elementos da coloração das asas entre os sexos em *Heliconius erato phyllis* e *H. besckei*?

(Abordagem métrica/quantitativa; segundo artigo).

CAPÍTULO 1

**Função sexual e caracterização comparada das cores de um padrão mimético em
borboletas *Heliconius*.**

(Artigo em preparação)

Redigido segundo as normas da revista *Animal Behaviour*

Função sexual e caracterização comparada das cores de um padrão mimético em borboletas *Heliconius*.

André Luis Klein¹, Marcelo Barbalho Pereira², Flavio Horowitz² e Aldo Mellender de Araújo¹.

¹ Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

² Laboratório de Laser e Ótica, Departamento de Física, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência – Aldo Mellender de Araújo:

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6717 Fax: +55 51 3316-7311.

E-mail: aldo1806@gmail.com

André Luis Klein:

E-mail: ndrklein@gmail.com

RESUMO

As cores que compõem um padrão nas asas de borboletas podem funcionar como sinais de reconhecimento de parceiros, gerando um conflito em potencial com a função de alertar e ensinar predadores no caso de espécies miméticas. Neste trabalho, verificamos a importância das cores das fêmeas para a aproximação e o início do cortejo por machos de *Heliconius erato phyllis*. Também caracterizamos as cores desta espécie e de seu mímico *H. besckei* por espectrofotometria. Os machos de *H. erato* utilizam, com o mesmo grau de importância, o vermelho e o amarelo das asas no reconhecimento de parceiras; sendo os estímulos visuais suficientes para iniciar o cortejo. As cores de *H. besckei* apresentaram uma diferença importante com *H. erato* no espectro ultravioleta, sugerindo um mecanismo para se evitar falhas de reconhecimento logo nas primeiras fases da interação.

Palavras-chave: comunicação visual, reconhecimento específico, padrão de coloração, ultravioleta, espectrofotometria.

INTRODUÇÃO

Estruturas biológicas geralmente possuem múltiplas funções, sendo usadas em mais de um contexto ecológico. As cores das borboletas miméticas constituem um exemplo claro disso, considerando sua importância na termorregulação, na defesa contra predadores e na comunicação intraespecífica (Scoble 1992). Essa multifuncionalidade, contudo, não pode ser generalizada de forma simples. Em primeiro lugar, é fundamental se verificar separadamente as supostas adaptações para cada fenótipo em particular. Em segundo lugar, um dado padrão de coloração consiste em um conjunto de elementos que podem ser analisados individualmente. Da mesma forma que os apêndices de artrópodes frequentemente são especializados para tarefas distintas em um mesmo indivíduo – sensorial, locomotora e reprodutiva, p. ex. – cada elemento de um padrão de coloração pode ter sido ajustado, em menor ou maior grau, para um contexto ecológico diferente.

As funções de defesa e reconhecimento específico podem ser conflitantes em borboletas, já que a primeira requer padrões difíceis de detectar (coloração críptica) ou que confundem (mimetismo), enquanto que a segunda demanda uma alta razão sinal/ruído e exclusividade com respeito à espécie (Silberglied 1984 e Vane-Wright e Boppré 1993). Este conflito em potencial se torna ainda mais grave quando as espécies miméticas são filogeneticamente próximas, já que estas muitas vezes também compartilham padrões comportamentais e de utilização de recursos (Vane-Wright e Boppré 1993). É possível, contudo, que espécies nesta situação garantam a eficiência do reconhecimento de parceiros utilizando-se de vias alternativas de comunicação; mais provavelmente a química no caso de Lepidoptera, ou através de cores fora do espectro visível aos predadores.

As borboletas *Heliconius* exibem uma série de raças geográficas que, em simpatria, convergiram no padrão de coloração assim como no hábitat (Brown 1979 e Turner 1981). Em *Heliconius erato petiverana* (que possui uma mancha vermelha e uma barra amarela) foi demonstrada a importância da mancha vermelha para diminuir o número de ataques por predadores (Benson 1972). Em *H. erato hydara* (que possui apenas a mancha vermelha) o vermelho se revelou como um dos estímulos disparadores do cortejo em machos (Crane 1955). Diferentemente desta, já foi sugerido que *H. besckei* (mesmo padrão de *H. erato petiverana*) utilizaria o amarelo das asas como sinal de reconhecimento específico (Emsley 1970).

Estrada e Jiggins (2008) demonstraram a ocorrência de falhas de reconhecimento no cortejo entre raças de *H. erato* e seus respectivos comímicos de *H. melpomene*. Cada subespécie de um par mimético utiliza os mesmos sinais visuais para a localização e o reconhecimento prévio de parceiros e gasta um tempo considerável abordando e cortejando seus comímicos. À menor distância, contudo, ambas distinguem coespecíficos de heteroespecíficos, de modo que esta confusão de sinais pode resultar em perda de aptidão através do desperdício de energia e tempo, mas não de gametas. Além disso, o comportamento dos machos diante de modelos sugeriu que estímulos visuais são mais importantes para *H. melpomene* do que para *H. erato*. O reconhecimento de parceiros em *H. erato* dependeria mais fortemente de sinais químicos. Esta espécie é a única das duas em que os machos realizam cruzamento pupal – estratégia em que os machos procuram por pupas de fêmeas, provavelmente por pistas químicas, e as guardam, copulando imediatamente após a emergência (Deinert 2003; Estrada *et al.* 2009).

Briscoe e colaboradores (2010) constataram que *Heliconius* possui dois pigmentos visuais sensíveis ao ultravioleta; enquanto que as demais borboletas possuem apenas um. O

novo pigmento teria evoluído via seleção positiva seguindo uma duplicação recente. O mesmo estudo também demonstrou que as asas de *Heliconius* apresentam maior variação espectral na faixa do ultravioleta do que as demais espécies dentro de *Heliconiinae*. Mais surpreendentemente, evidências estatísticas e bioquímicas revelaram que o novo pigmento dos olhos evoluiu em paralelo com os pigmentos ultravioleta das asas. Essas descobertas sugerem um possível mecanismo sensorial para a discriminação específica dentro do gênero.

Heliconius erato phyllis e *H. besckei* são mímicos que ocorrem em simpatria nas regiões sul e sudeste do Brasil. A primeira possui distribuição muito mais ampla, do sul ao norte do país; já a segunda é uma espécie pouco abundante, sendo encontrada apenas em locais com altitude superior a 700 m (Brown 1979). Neste trabalho, investigamos os elementos da coloração mimética destas borboletas sob duas abordagens; uma funcional e outra comparada. Primeiramente, avaliamos a função das cores de *H. e. phyllis*, a única das duas que realiza cruzamento pupal, como sinais de reconhecimento de parceiros. Se a coloração das asas possui esta função, se espera que a ausência de um dos elementos do padrão em modelos de fêmeas diminua sua atratividade aos machos. A segunda abordagem consistiu na caracterização das cores de ambas as espécies por espectrofotometria, a fim de verificar se existem diferenças entre elas, principalmente fora do nosso espectro visível. No caso de as cores serem importantes como critérios de localização e reconhecimento de parceiros, é previsto que haja alguma diferença na natureza da coloração entre as espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimentos comportamentais

A metodologia deste trabalho foi adaptada de Jiggins *et al.* (2001) e Jiggins (comunicação pessoal). Foram usados modelos construídos com asas reais através do seguinte procedimento: duas fêmeas recém-eclodidas eram mortas por congelamento e tinham suas asas extraídas. As asas eram imersas em hexano por 1h para a extração de qualquer possível composto volátil. Em seguida, estas eram coladas pela sua base em um pedaço de papel cartão de 8x4 mm e unidas por uma tira estreita de fita adesiva de modo a manter um espaço de 8 mm entre o lado direito e o esquerdo. Para aumentar a similaridade entre os modelos controle e tratamento, cada um foi montado com as asas de um lado provenientes da primeira fêmea e as do outro lado da segunda. No centro desta fita, onde ficaria o corpo da borboleta, era colado um canudo de suco de 25 mm de comprimento. Os papéis, a fita adesiva e o canudo eram pintados de preto com marcador permanente para retroprojeter. Nos tratamentos, um dos dois elementos da coloração das asas – a mancha vermelha nas anteriores e a barra amarela nas posteriores – também foram pintados de preto. Nos controles, foi pintada uma área similar da região preta das asas, sem alterar o vermelho nem o amarelo (Figura 1).

Através do canudo, os modelos controle e tratamento eram encaixados em uma estrutura de arame e PVC, mantendo-se uma distância de 1m entre eles. Ao redor de cada modelo foi demarcada uma área esférica de 50 cm de diâmetro com duas circunferências de arame posicionadas ortogonalmente (Figura 2). O movimento da estrutura de PVC através

de um barbante fazia com que os modelos movessem suas asas de forma semelhante a borboletas em voo.

O experimento foi feito em um viveiro contendo apenas machos (três grupos com cinco a sete indivíduos, totalizando 20 machos) onde, por 20 min, eram registrados em uma planilha dois tipos de interação com os modelos: *aproximação* – toda vez que um macho entrava na área esférica demarcada; e *inspeção* – um voo sustentado do macho direcionado para o modelo, que caracteriza o início da corte nesta espécie (Klein e Araújo 2010).

Os grupos experimentais consistiram em: ‘sem vermelho’ vs. ‘controle’, ‘sem amarelo’ vs. ‘controle’ e ‘sem vermelho’ vs. ‘sem amarelo’. Foram realizados 12 testes em cada experimento (quatro testes com cada um dos três grupos de machos). Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Espectrofotometria

Cada uma das quatro cores medidas – vermelho dorsal, amarelo dorsal, vermelho ventral e amarelo ventral – era sempre extraída de uma mesma região da asa (Figura 3). Esta amostra era colada sobre uma fita adesiva preta presa a uma lâmina de vidro e, por cima dela, era colocada outra fita adesiva preta com um orifício quadrado de 3 mm de lado. A lâmina era posicionada dentro do espectrofotômetro, o qual tinha seu feixe de luz delimitado por um orifício circular de 2 mm de diâmetro. Foi realizada espectrofotometria difusa em um modelo Cary 5000 UV-Vis-NIR (Laboratório de Laser e Ótica – Instituto de Física, UFRGS). Para *H. erato* foram amostrados quatro indivíduos de cada sexo, provenientes de laboratório. Para *H. besckei* foram utilizadas duas fêmeas e dez machos, capturados em campo.

RESULTADOS

Experimentos comportamentais (*H. erato phyllis*)

O modelo sem a mancha vermelha teve menor probabilidade de aproximação e de inspeção pelos machos do que o modelo controle (Figura 4). Os valores absolutos (média \pm DP) de aproximações ao controle e tratamento foram, respectivamente, $26,8 \pm 13,3$ e $12,5 \pm 7,3$; e de inspeções foram $16,1 \pm 11,1$ e $5,8 \pm 4,1$. A partir dos valores absolutos e considerando-se o tempo de cada observação (20 min) podemos ter uma idéia da dinâmica dos experimentos, i.e. do número de interações por unidade de tempo. O modelo sem a barra amarela também foi menos atraente do que o controle (Figura 5). Neste teste, os valores absolutos de aproximações foram $22,6 \pm 12,3$ para o controle e $11,9 \pm 6,1$ para o tratamento; e de inspeções foram $24,0 \pm 11,1$ e $4,6 \pm 2,7$.

Não encontramos nenhuma diferença significativa no experimento ‘sem vermelho’ vs. ‘sem amarelo’ (Figura 6). É interessante observar, ainda, que todos os valores absolutos diminuíram neste experimento, ou seja, não houve apenas ausência de preferência, mas também um menor número total de interações com os modelos (Aproximação: $10,8 \pm 5,3$ para ‘sem vermelho’ e $9,9 \pm 4,2$ para ‘sem amarelo’; Inspeção: $10,8 \pm 6,4$ para ‘sem vermelho’ e $9,0 \pm 8,5$ para ‘sem amarelo’).

Espectrofotometria

Os resultados das medidas por espectrofotometria estão apresentados na Figura 7. No vermelho dorsal (Figura 7a) se destaca o pico de ultravioleta na faixa dos 350 nm em *H.*

erato, mas quase ausente em *H. besckei*. Mesmo no indivíduo mais intacto de *H. besckei* – 07 – esta ausência se manteve (este indivíduo não apresentava nenhum desgaste das asas e as cores eram bem vistosas quando capturado, tendo aparentemente emergido há não mais do que dois dias).

No amarelo dorsal (Figura 7b), nenhuma diferença interespecífica nos chamou a atenção. Entre os machos de *H. erato* (gráfico inferior da esquerda), contudo, o indivíduo 08 apresentou um padrão discrepante na faixa do ultravioleta. O pico de aproximadamente 320 nm é mais intenso e surgiu um pico exclusivo de reflectância na faixa dos 250 nm. A medida desta amostra foi replicada para averiguar se não havia ocorrido erro de alinhamento da lâmina, mas o mesmo padrão foi encontrado.

Dentre as amostras do vermelho ventral (Figura 7c), não observamos diferenças consistentes entre os grupos. Por fim, no amarelo ventral (Figura 7d), novamente uma variação individual entre os machos de *H. erato* (gráfico inferior da esquerda) chamou a atenção. Os indivíduos 07 e 08 apresentaram os picos de 250 e 330 nm muito mais intensos do que os outros dois amostrados. Também houve uma variação de reflectância entre os machos de *H. besckei*, embora as diferenças não tenham sido tão discrepantes.

DISCUSSÃO

A função sexual das cores

Nossos resultados demonstraram que os mesmos elementos da coloração envolvidos no mimetismo com *H. besckei* também são usados no reconhecimento específico pelos machos de *H. erato phyllis*. Tanto a mancha vermelha quanto a barra amarela são

importantes para que as fêmeas sejam localizadas e para disparar o início do cortejo. A ausência de preferência e a queda do número total de interações quando não havia um modelo com o padrão normal (terceiro experimento) revelaram que as duas cores têm a mesma importância e provavelmente funcionam de forma complementar como partes de um sinal multimodal de reconhecimento. Essa idéia vai contra a dicotomia sugerida por Emsley (1970) de que o sinal disparador do cortejo seria o vermelho em *H. e. phyllis* e o amarelo em *H. besckei*. É possível que o sinal multimodal de *H. e. phyllis* inclua ainda outros componentes não testados aqui – forma das asas, postura e movimento, por exemplo. A partir dos nossos experimentos também podemos dizer que os estímulos visuais são suficientes para atrair os machos e disparar o comportamento que caracteriza o início da corte. Essas conclusões reforçam a possibilidade de haver alguma confusão de reconhecimento entre *H. erato phyllis* e *H. besckei*. O cortejo equivocado entre espécies devido à sua similaridade fenotípica, denominado interferência reprodutiva, é um fenômeno comum entre animais (Gröning e Hochkirch 2008) e é proposta como uma das razões para que não ocorra a convergência mimética até um único padrão de coloração entre espécies impalatáveis simpátricas (Brower *et al.* 1963).

É sabido que a localização de parceiros e as primeiras fases do cortejo em borboletas são mediadas essencialmente por estímulos visuais, ao passo que os feromônios geralmente agem nas fases mais tardias das interações (Scott 1973 e Rutowski 1984). Nas espécies em questão, se poderia esperar que os machos de *H. e. phyllis* dependessem de pistas químicas para encontrar as fêmeas, já que é provavelmente assim que as localizam na fase de pupa (Deinert 2003; Estrada *et al.* 2009). Inclusive, em *Heliconius* observa-se o padrão intrigante de que o mimetismo é frequentemente encontrado entre uma espécie do clado do cruzamento pupal e outra fora dele (Gilbert 1991); talvez justamente para diminuir

a confusão interespecífica entre os canais de comunicação. Contudo, o fato de termos utilizado apenas asas na construção de nossos modelos (de indivíduos já mortos há algumas semanas) e de tratá-las quimicamente revelou que os machos são atraídos visualmente por fêmeas adultas, localizando-as e reconhecendo-as independentemente de feromônios. As fases subsequentes do cortejo provavelmente são mediadas por estímulos químicos, de modo que as interações com modelos aqui registradas não duravam mais do que poucos segundos.

Se levarmos em consideração a suficiência do padrão de coloração de *H. e. phyllis* para atrair os machos e estimular sua iniciação do cortejo, torna-se muito provável que os machos que vivem em simpatria com *H. besckei* também persigam e cortejem fêmeas heteroespecíficas. Apesar de tal cortejo não prosseguir por diferenças de resposta das fêmeas ou por bloqueios químicos, os machos de *H. e. phyllis* ainda estariam desperdiçando tempo e energia com tais interações equivocadas. A única forma de se diminuir falhas de reconhecimento desde as primeiras fases da interação sexual – se estas são mediadas pela coloração – é o caso de as cores não serem realmente idênticas. Como sugerido em Briscoe *et al.* (2010), pigmentos ultravioleta podem ser a solução para uma discriminação específica eficiente entre conínicos.

Variação das cores no ultravioleta

Encontramos um pico de reflectância ultravioleta, ao redor de 350 nm, exclusivo de *H. e. phyllis* na mancha vermelha dorsal das asas. Briscoe e colaboradores (2010) apresentaram evidências de duas opsinas sensíveis ao ultravioleta em *H. erato*, em 355 nm e 398 nm. Portanto, a diferença que demonstramos é perceptível aos membros da espécie.

O fato de este pico existir em *H. e. phyllis*, mas não em *H. besckei* sugere um mecanismo de reconhecimento específico que poderia amenizar a confusão de sinais logo nas primeiras etapas da interação, mediadas visualmente – i.e. localização e inspeção. A constatação de que esses pigmentos sensíveis ao ultravioleta evoluíram por seleção positiva seguindo uma duplicação recente (citação acima) dá suporte a esta hipótese. Em borboletas, é comum o uso de cores ultravioleta na comunicação sexual (Silberglied 1984; Papke *et al.* 2007). Em *Heliconius*, já foi demonstrada a importância de luz polarizada no reconhecimento específico (Sweeney *et al.* 2003). Se as cores ultravioleta possuem a mesma função, especialmente em pares miméticos, é uma questão a ser explorada que pode contribuir substancialmente para o conhecimento da especiação e diversificação fenotípica no gênero.

A variação intraespecífica encontrada em *H. e. phyllis*, mais especificamente no amarelo dorsal e ventral dos machos, nos leva a questionar se estas diferenças têm algum reflexo no seu sucesso reprodutivo. Machos com picos mais intensos ou exclusivos de luz ultravioleta poderiam ser preferidos pelas fêmeas; seja por uma escolha ligada a benefícios diretos ou indiretos ou simplesmente por serem estímulos mais efetivos, desencadeando respostas mais intensas por parte das fêmeas (Ryan 1998). Futuramente, testes de atratividade usando modelos de machos cujo comprimento de onda das cores tenham sido previamente medidos podem responder a questão levantada acima.

Demonstramos o uso das cores das fêmeas no reconhecimento de parceiras pelos machos de *H. e. phyllis* e encontramos um padrão de variação favorável à hipótese do uso das cores no isolamento reprodutivo entre *H. e. phyllis* e *H. besckei*. A importância de cores ultravioleta no reconhecimento específico destas espécies pode ser explorada tanto de forma experimental quanto por análises populacionais. Comparar o padrão de coloração entre indivíduos de populações simpátricas e alopátricas com a espécie mimética pode

fornecer evidências de deslocamento de caracteres. A eficiência do reconhecimento visual de parceiros pode ser testada pelo uso de modelos coespecíficos *vs.* heteroespecíficos. Também com esta metodologia, resta verificar a importância das cores das asas no reconhecimento de parceiros em *H. besckei*.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos integrantes do nosso laboratório que colaboraram com a criação das lagartas e dos imagos durante este estudo (Ana Carolina Bahi Aymone, Janaína De Nardin e Mariana Giozza). Agradecemos também a Chris Jiggins pelas instruções detalhadas sobre a construção dos modelos experimentais e a Luiz Ernesto Costa-Schmidt por sugestões que melhoraram a organização de nosso artigo. Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e pela bolsa de mestrado concedida a um dos autores (ALK).

REFERÊNCIAS

- Benson, W. W.** 1972. Natural Selection for Mülerian Mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science*. **176**: 936-939.
- Briscoe, A. D., Bybee, S. M., Bernard, G. D., Yuan, F., Sison-Mangus, M. P., Reed, R. D., Warren, A. D., Llorente-Bousquets, J. e Chiao, C. C.** 2010. Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(8): 3628-3633.

- Brower, L. P., Brower, J. V. Z e Collins, C. T.** 1963. Experimental studies of mimicry. 7. Relative palatability and Müllerian mimicry among neotropical butterflies of the subfamily Heliconiinae. *Zoologica* **48**: 654-84.
- Brown, K. S.** 1979. *Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais*. Unicamp, Campinas. Tese de doutorado.
- Crane, J.** 1955. Imaginal behavior of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydara* Hewitson, with special reference to the social use of color. *Zoologica* **40**: 167-196.
- Deinert, E. I.** 2003. Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In Boggs, C. L., Watt, W. B. e Ehrlich, P. R. (eds.). *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 91-108.
- Emsley, M. G.** 1970. An observation on the use of color for species recognition in *Heliconius besckei* (Nymphalidae). *J. Lepid. Soc.* **24**: 25.
- Estrada, C. e Jiggins, C. D.** 2008. Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? *J. Evol. Biol.* **21**: 749-760.
- Estrada, C., Yildizhan, S., Schulz, S. e Gilbert, L. E.** 2009. Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. *Proc. R. Soc.B.* **277**(1680):407-413.
- Gilbert, L. E.** 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: patterns, process, and problems. In: Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, T. W. e Benson, W. W. (eds.). *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. John Willey & sons, New York. pp. 403-427.
- Gröning, J. e Hochkirch, A.** 2008. Reproductive interference between animal species. *Quart. Rev. Biol.* **83** (3): 257-282.

- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J.** 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*. 411: 302-305.
- Klein, A. L. e Araújo, A. M.** 2010. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? *Journal of Ethology*. **28**: 409-420.
- Papke, R. S., Kemp, D. J., Rutowski, R. L.** 2007. Multimodal signaling: structural ultraviolet reflectance predicts male mating success better than pheromones in the butterfly *Colias eurytheme* L. (Pieridae). *Animal Behaviour*. 73: 47-54.
- Rutowski, R. L.** 1984. Sexual selection and the evolution of butterfly mating behavior. *J. Res. Lepid.* **23**: 125-142.
- Ryan, M. J.** 1998. Sexual Selection, Receiver Biases and the Evolution of Sex Differences. *Science*. **281**: 1999-2003.
- Scoble, M. J.** 1992. *The lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford univ. press, New York. 404 p.
- Scott, J. A.** 1973. Mating of butterflies. *J. Res. Lepid.* **11**: 99-127.
- Silberglied, R. E.** 1984. Visual communication and sexual selection among butterflies. In Vane-Wright, R. I. e Ackery, P. R. (eds.). *The Biology of Butterflies*, Academic, London, pp. 207-223.
- Sweeney, A., Jiggins, C. e Johnsen, S.** 2003. Polarized light as a butterfly mating signal. *Nature*. **423**: 31.
- Turner, J. R. G.** 1978. Why male butterflies are non-mimetic: natural selection, sexual selection, group selection, modification and sieving. *Biol.J. Linn.Soc.Lond.* **10**:385-432.
- Vane-Wright, R. I. e Boppré, M.** 1993. Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **340**: 197-205.

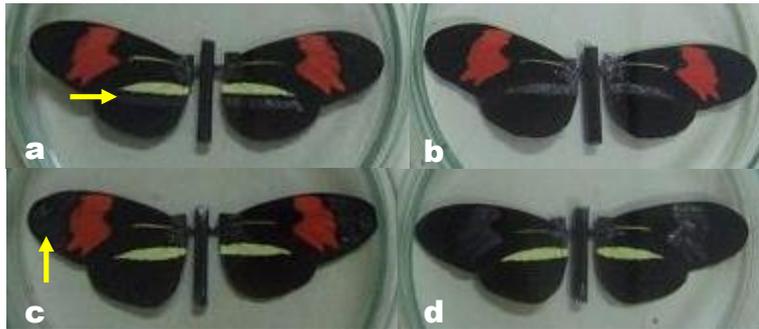


Figura 1. Modelos construídos com asas de fêmeas de *H. erato phyllis*. a) Controle amarelo; b) Sem amarelo; c) Controle vermelho; d) Sem vermelho. As setas indicam a região pintada de preto nos controles.

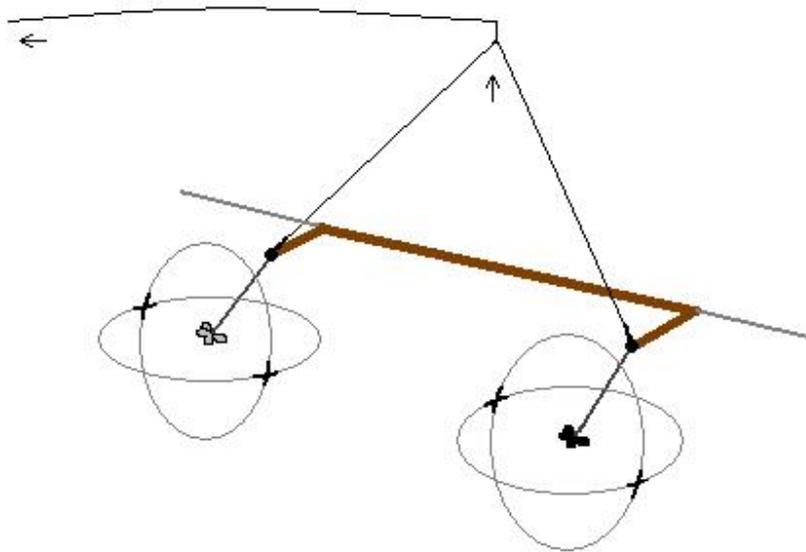


Figura 2. Esquema simplificado do experimento montado em viveiro. Os modelos controle e tratamento eram fixados na extremidade de hastes de arame, ao redor dos quais era demarcada uma área esférica de 50 cm de diâmetro. As setas indicam a direção em que o barbante era puxado para mover as asas dos modelos.

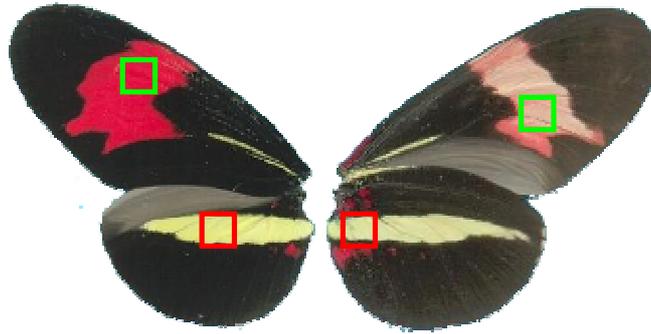


Figura 3. Regiões utilizadas nas amostras de espectrofotometria, tanto para *Heliconius erato phyllis* quanto para *H. besckei*.

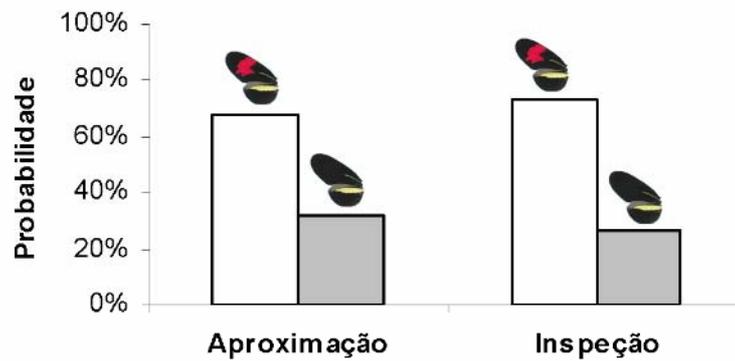


Figura 4. Probabilidades (%) de aproximação e inspeção aos modelos ‘controle’ e ‘sem vermelho’. **Aproximação:** controle = $68,1 \pm 9,2$; sem vermelho = $31,9 \pm 9,2$; $Z = -3,059$ ($p = 0,002$). **Inspeção:** controle = $73,6 \pm 18,3$; sem vermelho = $26,4 \pm 18,3$; $Z = -2,825$ ($p = 0,005$).

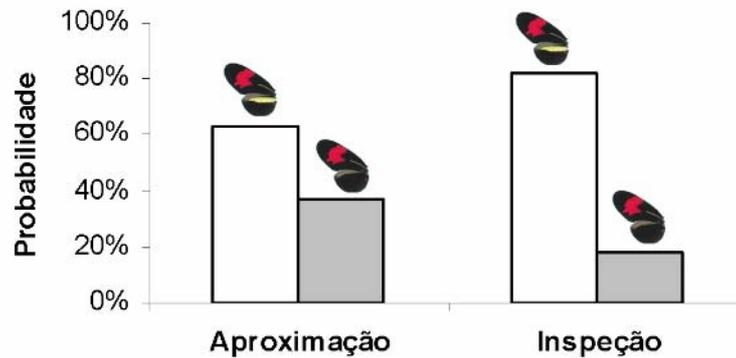


Figura 5. Probabilidades (%) de aproximação e inspeção aos modelos ‘controle’ e ‘sem amarelo’. **Aproximação:** controle = $62,9 \pm 16,1$; sem amarelo = $37,1 \pm 16,1$; $Z = - 2,197$ ($p = 0,028$). **Inspeção:** controle = $81,6 \pm 12,3$; sem amarelo = $18,4 \pm 12,3$; $Z = - 3,059$ ($p = 0,002$).

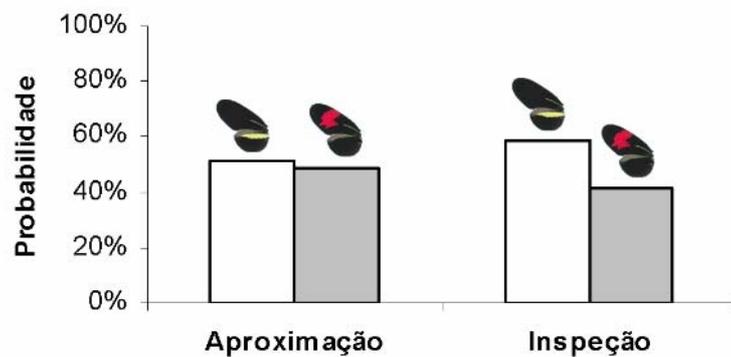
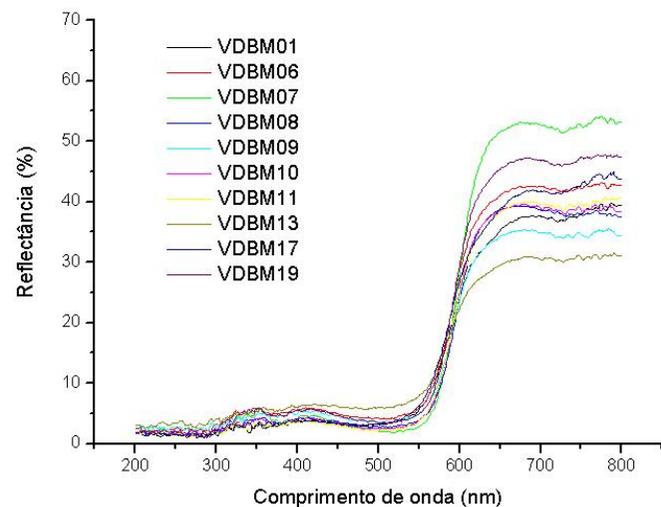
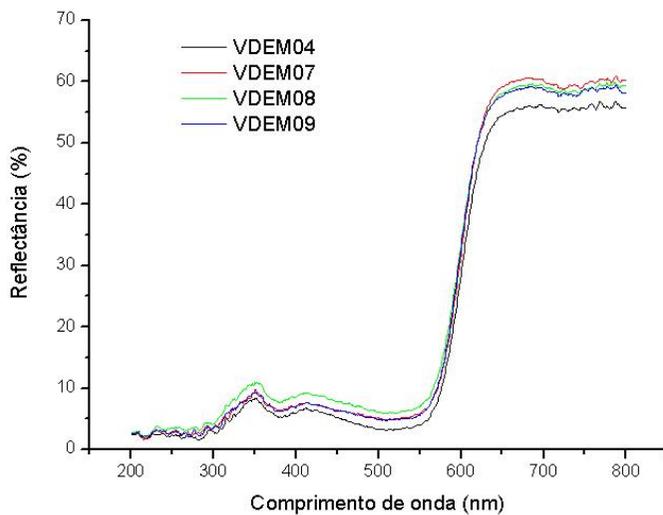
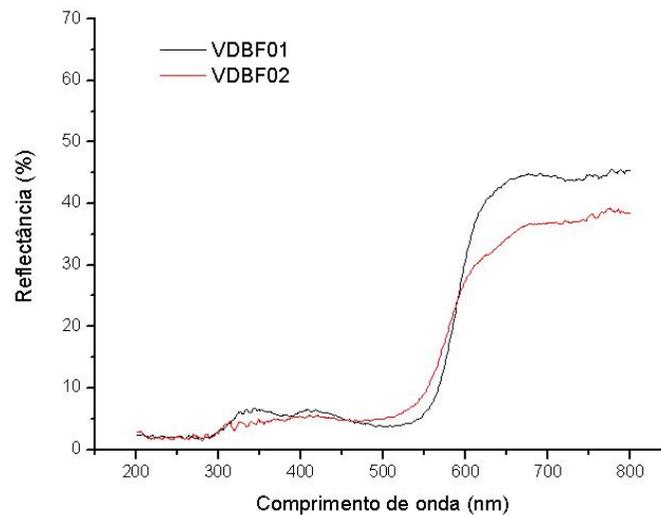
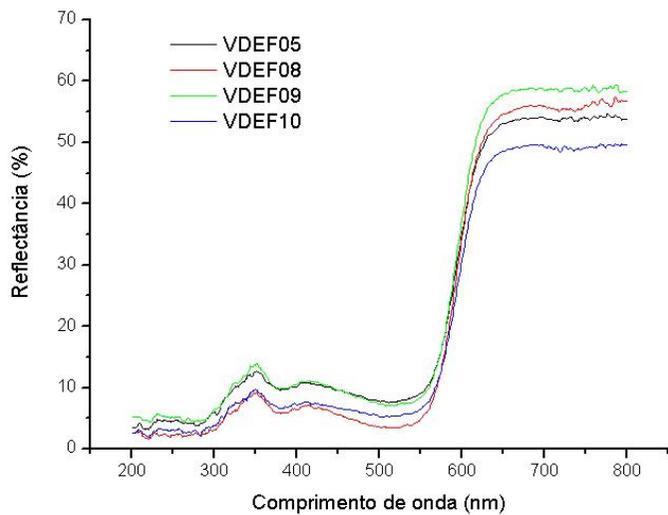
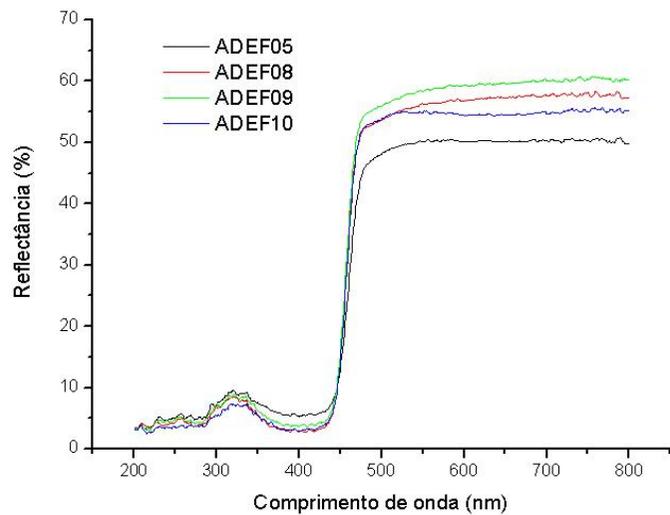


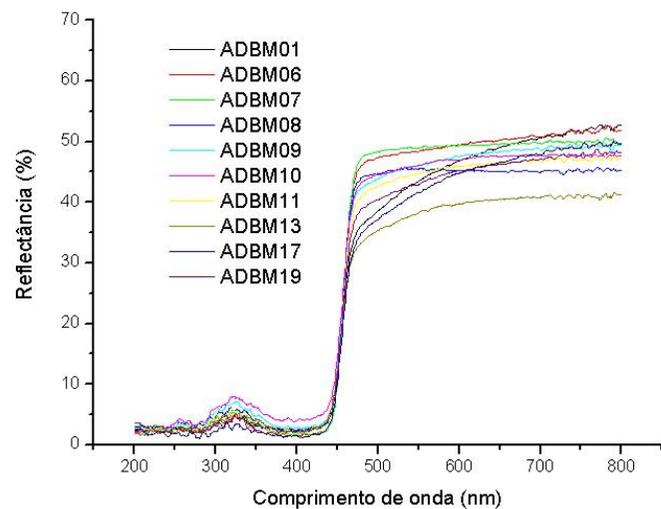
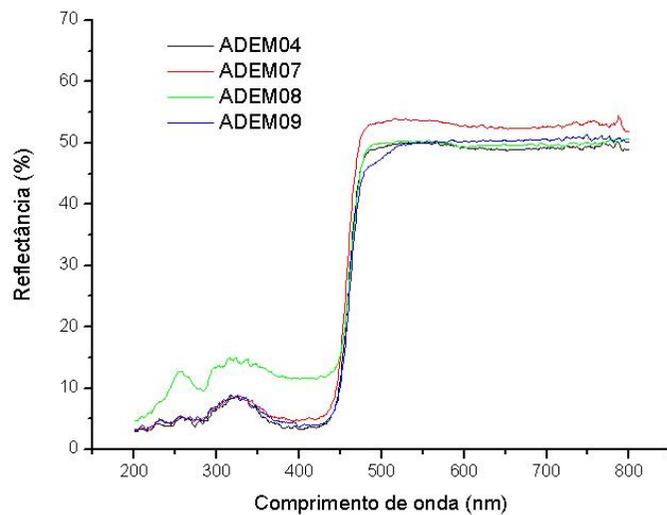
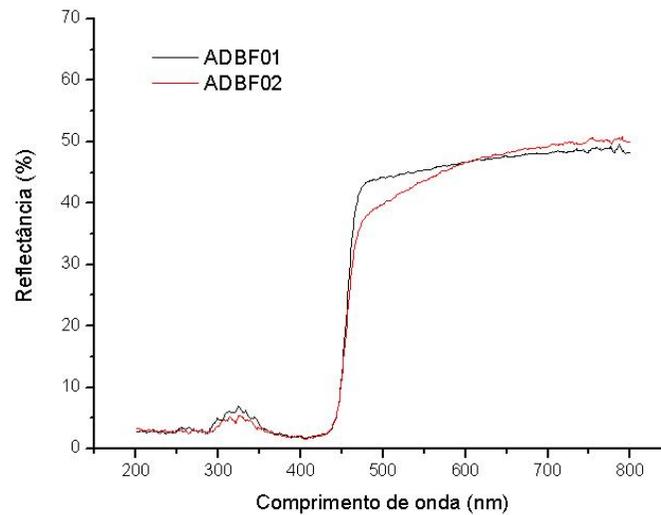
Figura 6. Probabilidades (%) de aproximação e inspeção aos modelos ‘sem vermelho’ e ‘sem amarelo’. **Aproximação:** sem vermelho = $51,7 \pm 18,3$; sem amarelo = $48,3 \pm 18,3$; $Z = - 0,356$ ($p = 0,722$). **Inspeção:** sem vermelho = $58,3 \pm 20,6$; sem amarelo = $41,7 \pm 20,6$; $Z = - 1,245$ ($p = 0,213$).

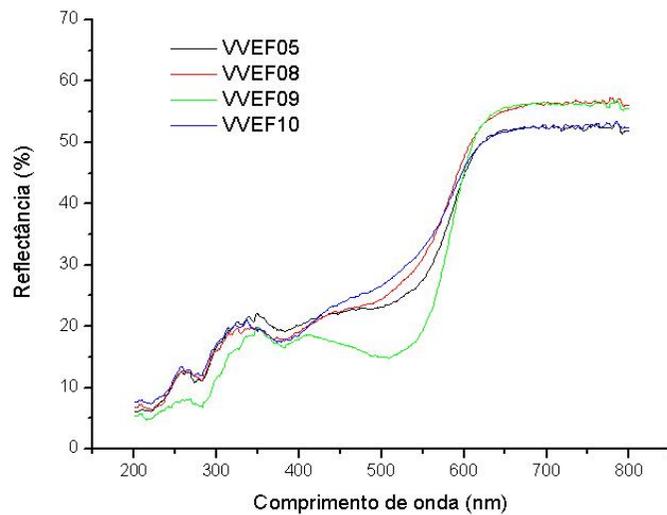
a



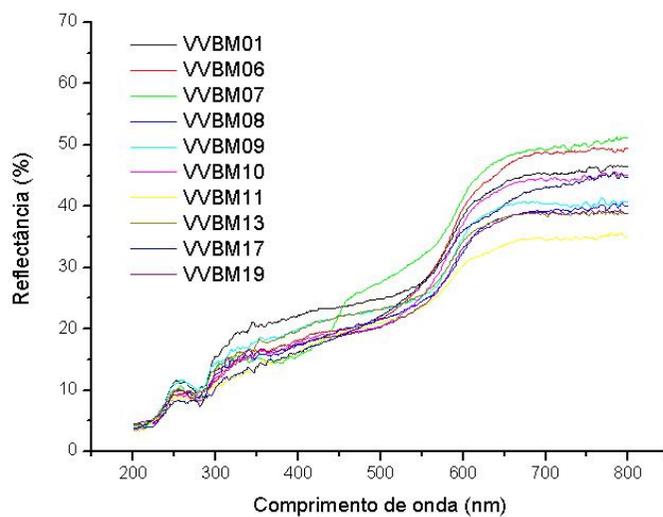
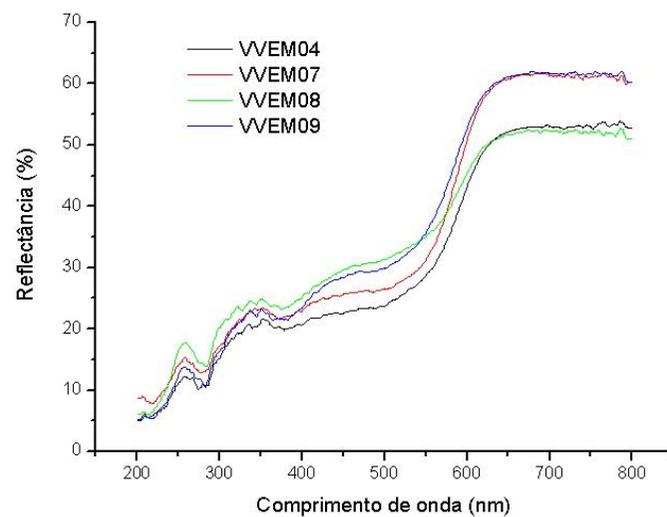
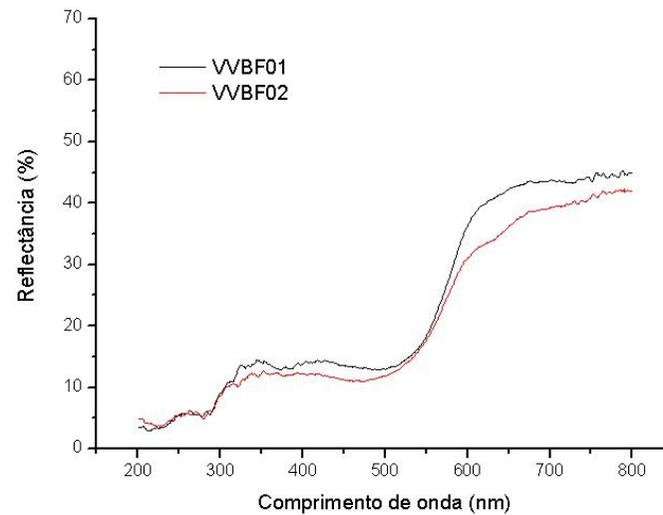


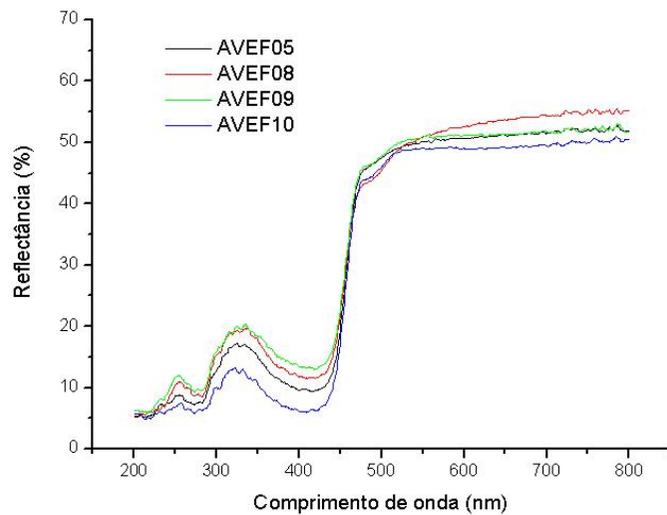
b





c





d

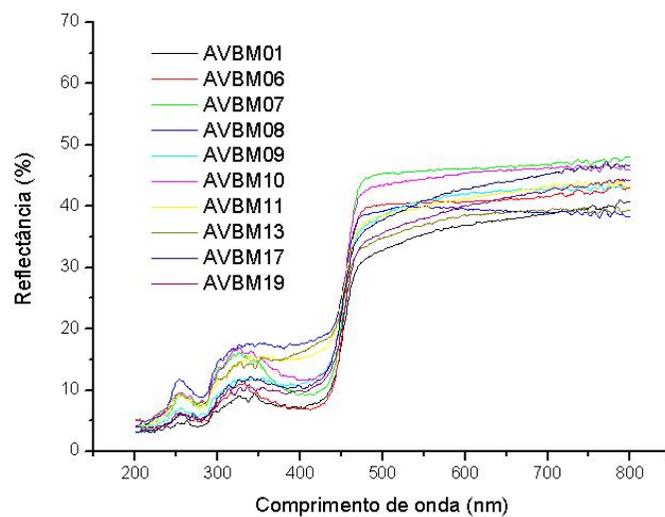
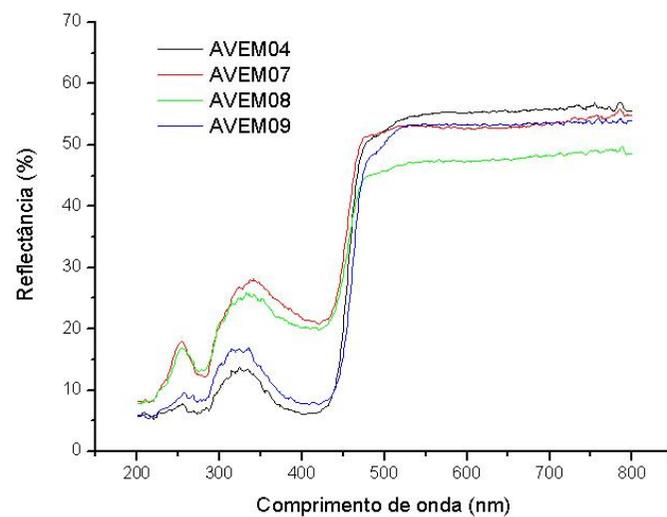
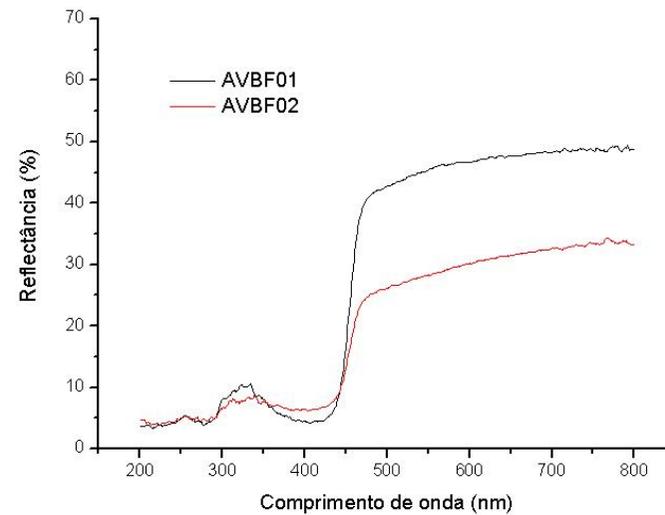


Figura 7. Cada conjunto de quatro gráficos, identificado por uma letra (a-d), está organizado da seguinte forma: superior – fêmeas; inferior – machos; esquerda – *H. erato*; direita – *H. besckei*. a) vermelho dorsal, b) vermelho ventral, c) amarelo dorsal e d) amarelo ventral. Cada curva do gráfico representa a amostra de um indivíduo e as letras do código de cada amostra informam, na ordem apresentada: cor, face da asa, espécie, sexo e indivíduo. Por exemplo, VDEF05 se refere ao vermelho dorsal de *H. erato* fêmea, indivíduo 05.

CAPÍTULO 2

**Variação de tamanho nos elementos da coloração das asas de duas borboletas
miméticas e o papel possível da seleção sexual.**

(Artigo em preparação)

Redigido segundo as normas da revista *Journal of Insect Behavior*

Variação de tamanho nos elementos da coloração das asas de duas borboletas miméticas e o papel possível da seleção sexual.

André Luis Klein e Aldo Mellender de Araújo

Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência – Aldo Mellender de Araújo:

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6717 Fax: +55 51 3316-7311. E-mail: aldo1806@gmail.com.

André Luis Klein:

E-mail: ndrklein@gmail.com

RESUMO

Modificações no padrão de coloração das asas de borboletas podem ser direcionadas por pressões seletivas diversas, relacionadas às suas diferentes funções ecológicas. Variações ligadas ao sexo, contudo, dão suporte para a seleção sexual. Neste trabalho, comparamos o tamanho dos elementos da coloração das asas das borboletas miméticas *Heliconius erato phyllis* e *H. besckei* entre machos e fêmeas. Também analisamos o grau de correlação entre o tamanho dos elementos dorsais e ventrais. Três dos quatro elementos medidos são maiores nos machos de ambas as espécies, mas a mancha sem variação não é a mesma. A forte correlação entre as faces dorsal e ventral sugere uma restrição evolutiva de desenvolvimento, mas outros fatores devem ser considerados. As funções de termorregulação e defesa são explicações possíveis para a ausência de dimorfismo em um dos elementos. Já o dimorfismo encontrado pode ser resultado de seleção sexual.

Palavras-chave: dimorfismo sexual, padrão de coloração, morfometria, restrições evolutivas, *Heliconius*.

INTRODUÇÃO

As cores das borboletas têm basicamente três funções: termorregulação, defesa contra predadores e sinalização sexual (Scoble 1992). As adaptações relacionadas à defesa são diversas e constituem um campo tradicional de estudos ecológico-evolutivos. Dentre elas estão o aposematismo, ou coloração de advertência, e associado a ele o mimetismo, onde espécies palatáveis (mimetismo Batesiano) ou impalatáveis (mimetismo Mülleriano) convergem para um mesmo padrão de coloração de modo a facilitar o aprendizado de predadores visualmente orientados, que evitam capturá-las (Bates 1862; Muller 1879).

A importância das cores como sinais sexuais em borboletas também é bem documentada, seja como critério de reconhecimento específico (Sweeney *et al.* 2003; Estrada e Jiggins 2008) ou de escolha de parceiros (Contanzo e Monteiro 2006). Mas aqui cabe introduzir um ponto importante: quando uma mesma característica é usada em dois ou mais contextos ecológicos, torna-se difícil estimar quais e com que intensidade cada pressão seletiva dirige a sua modificação ao longo do tempo. Este é um problema intrínseco do estudo de funções em biologia evolutiva e se aplica ao caso das cores das borboletas. O azul iridescente das borboletas *Morpho*, por exemplo, é usado como mecanismo de defesa, mas também é importante em interações sexuais (Young 1971), ocorrendo o mesmo com os ocelos das asas de *Bicyclus anynana* (Contanzo e Monteiro 2006).

Quando uma característica se manifesta diferentemente entre os sexos, contudo, somos levados a dar mais crédito para a seleção sexual. Em borboletas, casos de dicromatismo sexual acentuado são bem conhecidos (p. ex. *Doxocopa* spp. *Heraclides* spp., *Morpho* spp. e *Papilio* spp. – Canals 2003), mas constituem a exceção e não a regra (Rutowski 1997). Brower *et al.* (1967) sugeriu a idéia de que em espécies impalatáveis a

evolução de diferenças intraespecíficas na coloração poderia ser restringida pela seleção contra o desvio de um padrão aprendido pelos predadores. Por outro lado, é razoável pensar que mudanças mais sutis, que não alterem a natureza ou o padrão das cores, afetarão menos o seu ajuste como mecanismo de defesa. Pequenas diferenças quantitativas no tamanho das manchas das asas podem ser irrelevantes para os predadores, mas podem ser o resultado estatístico de um processo de escolha de parceiros, i.e., de seleção sexual epigâmica.

Apesar disso, temos que estar atentos a interpretações alternativas quando confrontados com características secundárias relacionadas ao sexo. Elas podem ser ligadas a funções não reprodutivas, como a termorregulação, por exemplo (Gilchrist 1990; Wiklund e Van Dyck 2002); situação em que seriam o produto de seleção natural *stricto sensu*. De fato, um grande número de trabalhos tem demonstrado que a seleção natural sozinha pode levar ao dimorfismo sexual, e que ambas as forças – seleção natural e sexual – frequentemente afetam em conjunto a evolução destes traços (Allen *et al.* 2011).

As borboletas do gênero *Heliconius* constituem um modelo para estudos evolutivos e muitas das descobertas ao seu respeito se relacionam estreitamente com os temas aqui tratados (mimetismo e seleção sexual). As preferências sexuais dos machos coevoluíram com mudanças dos padrões de coloração miméticos (Jiggins *et al.* 2004), provavelmente facilitado por uma forte associação genética entre estes traços (Kronforst *et al.* 2006), de modo que um passo crucial da especiação neste grupo parece ser a divergência no padrão de cores das asas (McMillan *et al.* 1997, Jiggins *et al.* 2001, Jiggins *et al.* 2004, Mavárez *et al.* 2006; Giraldo *et al.* 2008). A seleção sexual, portanto, foi um fator chave na diversificação dos padrões de cores dentro do gênero *Heliconius* e mesmo dentro de cada espécie. As preferências mais relevantes neste processo, contudo, são dos machos por padrões gerais de coloração nas fêmeas. Podemos levantar questões sobre seleção sexual no

sentido inverso, isto é, de preferências das fêmeas por características dos machos. Outra mudança de perspectiva que pode ser feita é a escala da variação. Ao invés de pensar nas diferenças de padrões de coloração que existem entre raças ou espécies, podemos focar em um único fenótipo e pensar em termos de mudanças quantitativas dentro deste padrão. Modificações nesta escala podem ser uma forma indireta de se detectar pressões seletivas e assim compreender melhor os diferentes contextos em que traços particulares são utilizados.

Neste trabalho, escolhemos duas espécies de *Heliconius* miméticas que são simpátricas em localidades do sul e sudeste do Brasil. *H. erato phyllis* possui distribuição muito mais ampla, do sul ao norte do país; já *H. besckei* é uma espécie pouco abundante, sendo encontrada apenas em locais com altitude superior a 700 m (Brown 1979). O padrão de coloração de ambas é muito similar, com uma mancha vermelha na asa anterior e uma barra amarela na posterior. As faces dorsal e ventral diferem basicamente na tonalidade destas manchas, mais fracas no lado ventral, e por uma linha vermelha marginal na face ventral da asa posterior em *H. besckei* (Figura 1).

O objetivo do presente trabalho foi verificar se existe diferença entre os sexos no tamanho dos principais elementos do padrão de coloração das asas de *H. erato phyllis* e *H. besckei*. Se o tamanho destes elementos é usado como critério de escolha de parceiros por um dos sexos, se espera encontrar alguma diferença. Também analisamos o grau de correlação entre o tamanho da mancha dorsal e a ventral de cada asa. Uma correlação fraca significaria maior independência de desenvolvimento entre elas e, portanto, uma menor restrição evolutiva para variações de tamanho em cada elemento.

MATERIAIS E MÉTODOS

As asas de *H. erato phyllis* utilizadas nas medidas foram obtidas de duas fontes: uma criação de laboratório constituída de pelo menos cinco proles e amostragens de oito populações naturais do Rio Grande do Sul e do Paraná (Brasil). Já as de *H. besckei* foram fotografadas de espécimes de museu (Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná) provenientes de populações naturais em diversas localidades do sul e sudeste do Brasil.

Amostras de laboratório (*H. erato phyllis*)

Indivíduos adultos de *H. erato phyllis* eram mantidos em viveiros sob condições seminaturais. A divisão em compartimentos permitia o controle da paternidade dos ovos, postados em plantas de *Passiflora suberosa* e *P. misera*. Os ovos coletados eram levados ao laboratório onde os imaturos eram criados sob temperatura controlada de 24-26°C e alimentados diariamente com folhas das mesmas plantas mencionadas acima. Os adultos eram congelados logo após sua eclosão.

Para a montagem das amostras, eram extraídas a asa anterior e a posterior do lado esquerdo do indivíduo (com exceção de quando elas estavam danificadas, utilizando-se o outro lado neste caso). Estas eram fixadas entre duas lâminas histológicas e digitalizadas com uma escala ao fundo (Figura 1). No total, obtiveram-se amostras de 44 machos e 33 fêmeas.

A partir das imagens digitais, as seguintes medidas de área foram obtidas através do programa *ImageJ* 1.42q: asa anterior, asa posterior, mancha vermelha dorsal, mancha

vermelha ventral, barra amarela dorsal e a barra amarela ventral (Figura 1). Com estas medidas, calculou-se ainda a área proporcional de cada elemento (área da mancha ou barra/ área da asa em que se encontra).

Amostras de campo (*H. erato phyllis*)

As asas de indivíduos de campo se originaram de coletas realizadas entre os meses de dezembro de 1996 e abril de 1997, e entre março e abril de 1998, durante o andamento de outro estudo do nosso grupo. Ao todo foram capturadas borboletas de oito populações em três localidades: cinco populações do município de Santa Maria, RS (latitude -29° 41' 23"; longitude 53° 48' 25"); duas dos arredores da cidade de Porto Alegre, RS (latitude -30° 01' 59"; longitude 51° 13' 48") e uma dos arredores da cidade de Curitiba, PR (latitude -25° 25' 45"; longitude 49° 16' 23").

Estas asas foram digitalizadas com uma escala ao fundo, sem o preparo prévio com lâminas. Totalizou-se 248 machos e 137 fêmeas. As medidas foram obtidas da mesma forma explicada na sessão anterior.

Amostras de museu (*H. besckei*)

Para as medidas de *H. besckei*, os espécimes da coleção consultada foram fotografados com câmera digital fixada e uma escala sobre o substrato. De cada indivíduo, obteve-se uma foto da face dorsal e uma da ventral, a partir das quais era possível a medida da área da asa anterior e da posterior, respectivamente, além da área das manchas/barras. Foram fotografados 28 fêmeas e 74 machos. As medidas foram obtidas da mesma forma

que as demais amostras. A distância entre o espécime e o substrato sofria pequenas variações de uma foto para outra. Contudo, a utilização das medidas proporcionais elimina este problema, uma vez que nelas se leva em conta apenas a medida da asa e da mancha/barra, obviamente sempre no mesmo plano.

Análise estatística

Em ambas as espécies, todas as seis variáveis medidas (duas áreas de asas e quatro de manchas/barras) e mais as quatro áreas proporcionais foram comparadas entre machos e fêmeas através do teste-t no programa SPSS 15.0 Também foi feita a análise de correlação entre a mancha vermelha dorsal e a vermelha ventral e entre a barra amarela dorsal e a amarela ventral; separadamente para machos e fêmeas. Todos os conjuntos de dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, não sendo necessária qualquer transformação.

RESULTADOS

Comparações macho-fêmea em *H. erato phyllis*

Não houve diferença no tamanho das asas anteriores e posteriores entre machos e fêmeas de *H. erato phyllis*. Este resultado foi obtido tanto com as amostras de laboratório quanto com as de campo (Tabela 1).

Por outro lado, três dos quatro elementos da coloração medidos são maiores em machos do que em fêmeas: vermelho ventral, amarelo dorsal e amarelo ventral. Nas

amostras de laboratório os três apresentaram esta diferença quando considerada a área relativa, mas apenas o amarelo dorsal quando considerada a área absoluta. Já nas amostras de campo a diferença nos três elementos foi encontrada tanto através da área absoluta quanto da relativa (Tabelas 2 e 3).

Comparações macho-fêmea em *H. besckei*

Do mesmo modo que em *H. erato phyllis*, em *H. besckei* a área das asas não diferiu entre os sexos (Tabela 4).

Com relação aos elementos da coloração, novamente se encontrou que três são maiores em machos: vermelho dorsal (diferentemente de *H. erato phyllis*), amarelo dorsal e amarelo ventral (ambas coincidindo com *H. erato phyllis*). Estes resultados apareceram tanto na área absoluta quanto na relativa (Tabelas 5 e 6).

Correlações dorsal-ventral

Nas duas espécies a área da mancha vermelha dorsal apresenta forte correlação positiva com a da mancha vermelha ventral, ocorrendo o mesmo entre a barra amarela dorsal e a ventral. Para as amostras de *H. erato phyllis* de laboratório, os valores de r encontrados em machos foram 0,838 para o vermelho e 0,886 para o amarelo. Em fêmeas, os valores foram 0,779 para o vermelho e 0,812 para o amarelo. Todas as correlações foram altamente significativas ($p < 0,001$), corroborando os resultados encontrados com amostras de campo (Tabela 7).

DISCUSSÃO

Como já constatado em outros estudos com *H. erato phyllis* (Ramos e Freitas 1999; Jorge *et al.* 2011), não encontramos dimorfismo sexual no tamanho das asas nesta espécie, nem em *H. besckei*. O que demonstramos aqui é que três dos quatro elementos da coloração medidos em *H. erato phyllis* são maiores em machos do que em fêmeas, ocorrendo o mesmo em *H. besckei*. A mancha sem variação entre os sexos, contudo, não é a mesma. Em *H. erato phyllis* é o vermelho dorsal, enquanto que em *H. besckei* é o vermelho ventral.

O fato de não haver dimorfismo no tamanho das asas acaba por relevar o dimorfismo das manchas. Se pensarmos em causas seletivas para tal diferença, restam menos hipóteses possíveis do que no caso de as asas também variarem. Um dimorfismo no tamanho das asas poderia ser gerado pelas diferentes necessidades relacionadas ao voo em cada sexo, como oviposição e procura de parceiros – caso em que o dimorfismo das manchas/barras poderia ser apenas o subproduto da seleção sobre o tamanho das asas. Os resultados que encontramos, por outro lado, favorecem interpretações relacionadas às três funções das cores em borboletas – termorregulação, defesa e sinalização intraespecífica. De qualquer forma, as futuras investigações sobre as causas do padrão de variação aqui demonstrado devem levar em conta duas perguntas: 1) Por que três elementos da coloração dos machos são maiores do que nas fêmeas? e 2) Por que um elemento em particular não varia entre os sexos? Ainda, do ponto de vista comparativo, podemos questionar a diferença de dimorfismo entre as espécies.

Multifuncionalidade e restrições evolutivas

O custo térmico de se aumentar a área das manchas nas asas destas borboletas é intuitivo: quanto maiores as manchas, menor é a região preta e, assim, menor é a eficácia para absorver calor da luz solar. A necessidade de um tempo mais longo de aquecimento prévio implica em maior exposição a predadores e menor tempo dedicado à alimentação e reprodução (procura de fêmeas e oviposição). É possível que um dos sexos tenha necessidades de aquecimento diferentes do outro, uma vez que algumas de suas atividades diárias devem ser diferentes (pelo menos aquelas relacionadas à reprodução). A função de termorregulação sozinha, contudo, não parece a mais plausível para se explicar dimorfismo sexual. Se a principal causa do dimorfismo fosse esta, se esperaria que as manchas vermelhas variassem, já que ocupam a maior porção da área das asas; mas são justamente estas (em uma das faces em cada espécie) que não diferem. Assim, como já demonstrado em outra borboleta (Ellers e Boggs 2006), as necessidades térmicas das espécies aqui tratadas podem estar em conflito com as mudanças direcionadas por seleção sexual; ou seja, a termorregulação seria uma restrição para a evolução do dimorfismo.

O modo como o aposematismo funciona nestas borboletas carece de detalhes na literatura. Não sabemos, por exemplo, se os predadores utilizam todos os componentes do padrão de coloração para aprender a evitá-los. Benson (1972) demonstrou claramente a importância defensiva do vermelho dorsal em populações naturais de *H. erato petiverana* (com o mesmo padrão de cores das espécies deste estudo). Se alguns elementos forem mais importantes que outros para alertar e ensinar os predadores a função aposemática poderia ser uma restrição para o dimorfismo sexual de seu tamanho. Não temos razões para pensar que os machos sejam mais vulneráveis a predadores do que as fêmeas e que o aumento de

suas manchas seria direcionado por uma pressão para a eficácia do sinal de advertência. Assim, da mesma forma que a termorregulação, a função defensiva parece se adequar melhor como restrição à variação no tamanho das manchas. Ainda é possível que ambos fatores (defesa e termorregulação) interajam e sirvam como restrição um ao outro (Lindstedt *et al.* 2008). Fazem-se necessários, contudo, experimentos que detectem o efeito da variação de cada componente do padrão de cores sobre a probabilidade de tais indivíduos serem predados.

O uso de sinais visuais na escolha de machos pelas fêmeas já foi demonstrado em algumas borboletas (Constanzo e Monteiro 2006 e Davis *et al.* 2007). Se pensarmos na seleção sexual epigâmica como causa do dimorfismo aqui apresentado, somos levados a perguntar que vantagem as fêmeas com preferências por machos com manchas maiores teriam sobre as demais. Não se sabe se o tamanho das manchas possui alguma correlação com fatores relacionados aos aportes nutricionais ou gaméticos dos machos. Se o custo de se produzir escamas coloridas for maior que o de se produzir as pretas, o tamanho das manchas dos machos poderia funcionar como “cauda de pavão”, ou seja, um sinal honesto de sua qualidade genética (Zahavi 1975). Outra possibilidade no contexto da seleção sexual é a não-adaptativa. A preferência das fêmeas por manchas maiores pode ser subproduto do seu uso como sinal de reconhecimento. Neste caso, manchas maiores seriam sinais mais eficientes para atrair fêmeas por razões puramente fisiológicas (Ryan *et al.* 1999). *H. erato phyllis* possui um ritual de cortejo elaborado, e uma etapa importante consiste no macho sobrevoando a fêmea que se encontra em pouso (Klein e Araújo 2010). Neste momento a face ventral do macho fica exposta à fêmea, quando talvez ocorra o uso das manchas na persuasão da parceira. As demais etapas consistem em perseguição em vôo, quando a

visualização das manchas deve ser bem menos acurada, e em momentos em que ambos estão em pouso, quando a comunicação química se torna mais relevante.

A partição espacial de sinais é uma das consequências possíveis do conflito de funções das cores em borboletas (Oliver *et al.* 2009). Enquanto componentes da face dorsal poderiam evoluir por seleção para proteção antipredatória (aposematismo e mimetismo) a ventral teria seu padrão moldado pelos requisitos da comunicação intraespecífica, por exemplo. Neste caso, devemos levar em conta o grau de independência de mudança entre a mancha dorsal e sua correspondente ventral; ou seja, se ambas podem responder separadamente à seleção. Nos resultados que encontramos, isto se torna importante especialmente pela mancha vermelha, que apresentou dimorfismo em apenas uma das faces para ambas as espécies. Nossas análises revelaram um alto grau de correlação entre elas, o que sugere forte restrição de desenvolvimento para suas variações independentes. Contudo, é possível que as duas faces tenham sido moldadas, em algum grau, para adaptações diferentes, mesmo sofrendo esta restrição (Rutowski *et al.* 2010).

Optamos por resumir os quadros apresentados acima propondo a seguinte hipótese a ser testada: em cada uma das duas espécies, o dimorfismo de tamanho dos elementos da coloração seria o resultado de seleção sexual epigâmica. Em ambas, contudo, o tamanho de uma das manchas vermelhas é restrito por seleção natural para termorregulação e/ou para o aposematismo. O porquê de tal restrição ocorrer na face dorsal em *H. erato phyllis* e na ventral em *H. besckei* pode ser resultado de diferenças comportamentais entre elas; seja no ritual de corte, no vôo, na fisiologia ou postura relacionada à termorregulação ou ainda em outras características.

Neste trabalho, encontramos um padrão de variação relacionado ao sexo. Os processos que levaram ao seu surgimento e que o mantêm, contudo, devem ser investigados

à parte. O uso de abordagens experimentais tem muito a contribuir com o teste de cada hipótese que se mostrar plausível para elucidar as questões aqui levantadas. Determinar a herdabilidade e o grau de plasticidade do tamanho destas manchas em cada espécie e para cada sexo é igualmente importante.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos integrantes do nosso laboratório que colaboraram com a criação das borboletas e imaturos durante este estudo (Ana Carolina Bahi Aymone, Janaína De Nardin e Mariana Giozza). Ao professor Olaf Mielke e ao ‘Laboratório de Lepidoptera Neotropical’ da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil) por disponibilizar os espécimes de Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure (Depto. de Zoologia – Universidade Federal do Paraná), à Andréa de Mello, que preservou as asas dos indivíduos por ela coletados durante seu doutorado e que constituíram a maior parte das amostras de nosso trabalho e ao Luiz Ernesto Costa-Schmidt por sugestões que melhoraram a organização de nosso artigo. Agradecemos também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e pela bolsa de mestrado concedida a um dos autores (ALK).

REFERÊNCIAS

Allen CE, Zwaan, BJ e Brakefield PM. (2011). Evolution of Sexual Dimorphism in the Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **56**: 445-64.

- Bates HW (1862) Contributions to the insect fauna of the Amazon valley: Lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc. Lond.* **23**: 495-566.
- Benson WW (1972) Natural Selection for Müllerian Mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science*. **176**: 936-939.
- Brower LP, Brower, JVZ e Corvino JM (1967) Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**: 893-898.
- Brown KS (1979) *Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais*. Unicamp, Campinas. Tese de doutorado.
- Canals GR (2003) Mariposas de Misiones; Butterflies of Misiones. L.O.L.A. ed. Buenos Aires, Argentina. 476 pp.
- Constanzo K e Monteiro A (2006) The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proc. R. Soc. B.* **274**: 845-851.
- Davis AK, Cope M, Smith A e Solensky M (2007) Wing Color Predicts Future Mating Success in Male Monarch Butterflies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100**(2): 339-344
- Ellers JE e Boggs CL (2003) The evolution of wing color: male mate choice opposes adaptive wing color divergence in *Colias* butterflies. *Evolution*. **57** (5): 1100-1106.
- Estrada C e Jiggins C (2008) Interspecific sexual attraction because of convergence in warning coloration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? *J. Evol. Biol.* **21**: 749-760.
- Gilchrist GW (1990) The consequences of sexual dimorphism in body size for butterfly flight and thermoregulation. *Functional Ecology*. **4**: 475-487.
- Giraldo N, Salazar C, Jiggins C, Bermingham E e Linares M (2008) Two sisters in the same dress: *Heliconius* cryptic species. *BMC Evol. Biol.* **8**: 324.

- Jiggins CD, Estrada C, Rodrigues A, (2004) Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconius melpomene* Linnaeus. *J. Evol. Biol.* 17: 680-691.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*. 411: 302-305.
- Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP e Freitas AVL (2011) Host-plant dependent wing phenotypic variation in *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society*. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2010.01610.x.
- Klein AL e Araújo AM (2010) Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? *Journal of Ethology*. **28**: 409-420.
- Kronforst MR, Young LG, Kapan DD, MacNeely C, O'Neill RJ e Gilbert LE (2006) Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 6575-6580.
- Lindstedt C, Lindström L e Mappes J (2008) Thermoregulation constrains effective warning signal expression. *Evolution*. **63(2)**: 469-478.
- Mavárez J, Salazar CA, Birmingham E, Salcedo C, Jiggins C e Linares M (2006) Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature* **441**: 868-871.
- McMillan WO, Jiggins CD, Mallet J (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 8628-8633.
- Müller, F 1879. *Ituna* and *Thyridia*; a remarkable case of mimicry in butterflies. *Trans. Entomol. Soc. Lond.* **1879**: xx-xxix.
- Oliver JC, Robertson KA e Monteiro A (2009) Accommodating natural and sexual selection in butterfly wing pattern evolution. *Proc. R. Soc. B*. **276(1666)**: 2369-2375.

- Ramos RR e Freitas AVL (1999) Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **53**: 11-21.
- Ryan MJ (1999) Sexual Selection, Receiver Biases and the Evolution of Sex Differences. *Science*. **281**: 1999-2003.
- Rutowski RL (1997) Sexual dimorphism, mating systems and ecology in butterflies. In Choe, J. C e Crespi, B. J. (eds.), *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 257-272.
- Rutowki, R. L., Nahm, A. C. e Macedonia, J. M. (2010). Iridescent hindwing patches in the Pipevine Swallowtail: differences in dorsal and ventral surfaces relate to signal function and context. *Functional Ecology*. **24**: 767-775.
- Scoble MJ (1992) *The lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford univ. press, New York. 404 p.
- Sweeney A, Jiggins C e Johnsen S (2003) Polarized light as a butterfly mating signal. *Nature*. **423**: 31.
- Wiklund C e Van Dyck H (2002) Seasonal butterfly design: morphological plasticity among three developmental pathways relative to sex, flight and thermoregulation. *J. Evol. Biol.* **15**: 216-225.
- Zahavi A (1975) Mate selection – A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**: 205-214.

Tabela 1. Média da área das asas (cm²) de *H. erato phyllis*. Laboratório: N_{fêmeas} = 33; N_{machos} = 42-44. Campo: N_{fêmeas} = 126-135; N_{machos} = 236-241.

Laboratório	Fêmeas	Machos	<i>t</i>
Asa anterior	4,67 ± 0,43	4,67 ± 0,43	- 0,031 (<i>p</i> = 0,976)
Asa posterior	3,55 ± 0,37	3,53 ± 0,34	0,186 (<i>p</i> = 0,853)
Campo			
Asa anterior	4,33 ± 0,56	4,38 ± 0,58	- 0,783 (<i>p</i> = 0,434)
Asa posterior	3,34 ± 0,45	3,36 ± 0,48	- 0,487 (<i>p</i> = 0,627)

Tabela 2. Média da área das manchas/barras (cm²) de *H. erato phyllis*. Laboratório: N_{fêmeas} = 33; N_{machos} = 42-44. Campo: N_{fêmeas} = 134-137; N_{machos} = 244-248. Diferenças significativas em negrito.

Laboratório	Fêmeas	Machos	<i>t</i>
Vermelho dorsal	0,978 ± 0,104	0,995 ± 0,101	- 0,704 (<i>p</i> = 0,483)
Vermelho ventral	0,802 ± 0,103	0,850 ± 0,111	- 1,928 (<i>p</i> = 0,058)
Amarelo dorsal	0,409 ± 0,059	0,459 ± 0,059	- 3,600 (<i>p</i> = 0,001)
Amarelo ventral	0,392 ± 0,060	0,418 ± 0,060	- 1,902 (<i>p</i> = 0,061)
Campo			
Vermelho dorsal	0,958 ± 0,145	0,952 ± 0,138	0,423 (<i>p</i> = 0,672)
Vermelho ventral	0,770 ± 0,140	0,801 ± 0,140	- 2,050 (<i>p</i> = 0,041)
Amarelo dorsal	0,374 ± 0,070	0,413 ± 0,069	- 5,244 (<i>p</i> < 0,001)
Amarelo ventral	0,367 ± 0,076	0,390 ± 0,074	- 2,924 (<i>p</i> = 0,004)

Tabela 3. Média da área relativa das manchas/barras (%) de *H. erato phyllis*. Laboratório: N_{fêmeas} = 33; N_{machos} = 41-44. Campo: N_{fêmeas} = 126-135; N_{machos} = 233-241. Diferenças significativas em negrito.

Laboratório	Fêmeas	Machos	<i>t</i>
Vermelho dorsal	21,0 ± 1,8	21,3 ± 1,5	- 0,838 (<i>p</i> = 0,404)
Vermelho ventral	17,2 ± 1,8	18,2 ± 1,6	- 2,408 (<i>p</i> = 0,018)
Amarelo dorsal	11,6 ± 1,3	13,0 ± 1,1	- 5,130 (<i>p</i> < 0,001)
Amarelo ventral	11,0 ± 1,3	11,9 ± 1,3	- 2,697 (<i>p</i> = 0,009)
Campo			
Vermelho dorsal	22,1 ± 1,8	21,8 ± 1,6	0,137 (<i>p</i> = 0,067)
Vermelho ventral	17,8 ± 2,1	18,3 ± 1,9	- 2,761 (<i>p</i> = 0,006)
Amarelo dorsal	11,2 ± 1,3	12,4 ± 1,4	- 7,806 (<i>p</i> < 0,001)
Amarelo ventral	11,0 ± 1,5	11,6 ± 1,5	- 4,051 (<i>p</i> < 0,001)

Tabela 4. Média da área das asas (cm²) de *H. besckei*. N_{fêmeas} = 25-27; N_{machos} = 71-73.

	Fêmeas	Machos	t
Asa anterior	4,18 ± 0,60	4,26 ± 0,52	- 0,618 (<i>p</i> = 0,538)
Asa posterior	3,26 ± 0,44	3,35 ± 0,43	- 0,887 (<i>p</i> = 0,377)

Tabela 5. Média da área das manchas/barras (cm²) de *H. besckei*. N_{fêmeas} = 27-28; N_{machos} = 72-74. Diferenças significativas em negrito.

	Fêmeas	Machos	t
Vermelho dorsal	0,881 ± 0,128	0,949 ± 0,116	- 2,587 (<i>p</i> = 0,011)
Vermelho ventral	0,845 ± 0,121	0,886 ± 0,119	- 1,518 (<i>p</i> = 0,132)
Amarelo dorsal	0,407 ± 0,065	0,471 ± 0,077	- 3,889 (<i>p</i> < 0,001)
Amarelo ventral	0,387 ± 0,062	0,456 ± 0,086	- 3,874 (<i>p</i> < 0,001)

Tabela 6. Média da área relativa das manchas/barras (%) de *H. besckei*. N_{fêmeas} = 24-27; N_{machos} = 69-73. Diferenças significativas em negrito.

	Fêmeas	Machos	t
Vermelho dorsal	21,2 ± 1,8	22,4 ± 1,8	- 2,896 (<i>p</i> = 0,005)
Vermelho ventral	20,3 ± 2,1	20,9 ± 2,1	- 1,170 (<i>p</i> = 0,245)
Amarelo dorsal	12,4 ± 1,2	14,1 ± 1,3	- 5,597 (<i>p</i> < 0,001)
Amarelo ventral	11,9 ± 1,3	13,6 ± 1,7	- 4,586 (<i>p</i> < 0,001)

Tabela 7. Correlação (*r* de Pearson) entre a área das manchas na face dorsal e ventral para *H. erato phyllis* (amostras de campo) e *H. besckei* (amostras de museu). *p* < 0,001 para todas as análises.

	<i>H. erato phyllis</i>		<i>H. besckei</i>	
	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Machos	0,909	0,912	0,807	0,684
Fêmeas	0,905	0,941	0,915	0,864

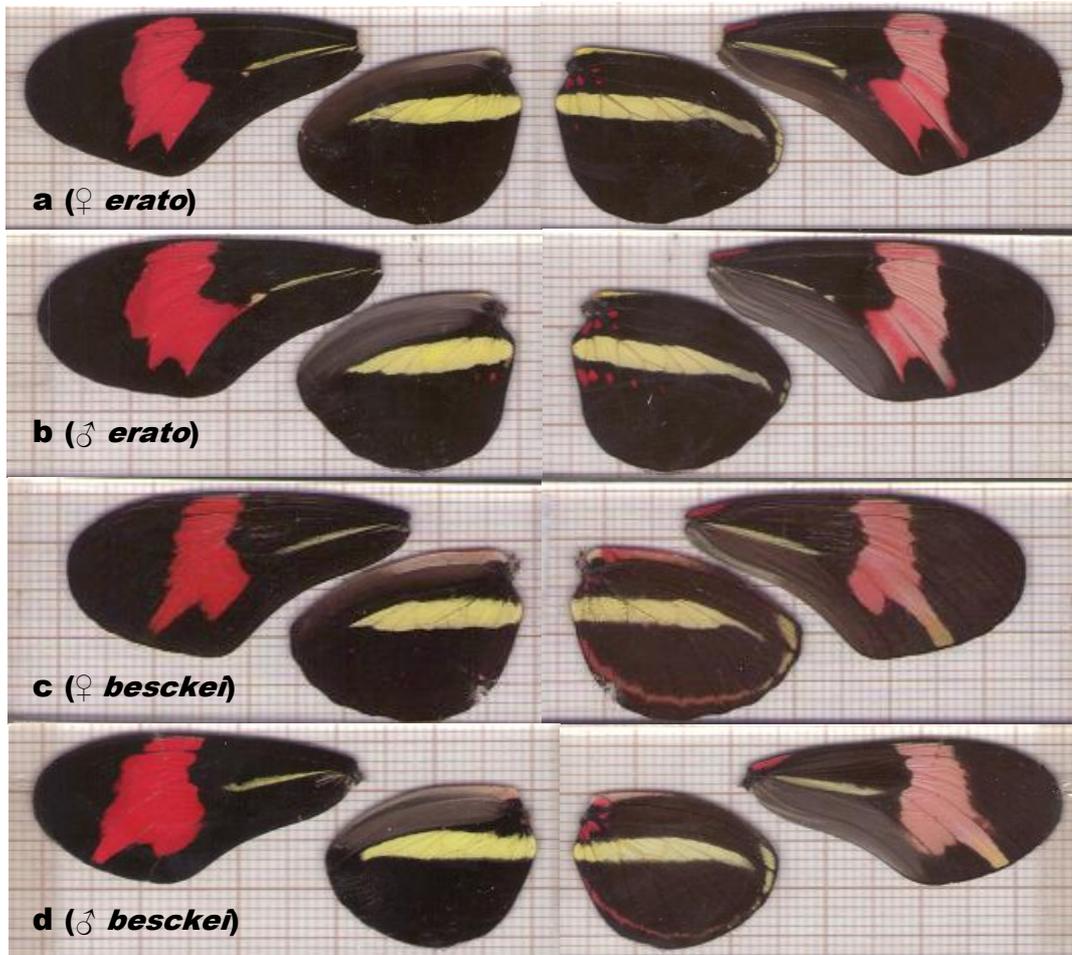


Figura 1. Faces dorsais (esquerda) e ventrais (direita) das asas de a) fêmea e b) macho de *Heliconius erato phyllis* e c) fêmea e d) macho de *Heliconius besckei*.

DISCUSSÃO

Síntese das conclusões

A abordagem comportamental desse estudo revelou a importância de cada um dos dois principais elementos do padrão de cores de *H. erato phyllis* no reconhecimento de parceiros pelos machos. Se a ausência da mancha vermelha ou da barra amarela faz com que a atratividade das fêmeas diminua, pode-se dizer que estas duas características possuem função no contexto sexual. Outra implicação dos resultados destes experimentos foi reforçar a idéia de um possível conflito de sinais entre *H. erato phyllis* e *H. besckei*, já que a aproximação e o início do cortejo na primeira foram estimulados pelos mesmos sinais visuais envolvidos no mimetismo com a segunda.

Nas análises por espectrofotometria, encontramos uma diferença interespecífica na natureza da coloração dentro da faixa ultravioleta. Um pico de reflectância bem marcado na mancha vermelha dorsal de *H. erato* é quase ausente em *H. besckei*, sugerindo um possível mecanismo de reconhecimento específico visual entre estes mímicos, o que amenizaria a confusão de sinais já no início da interação. Além disso, também houve uma variação intraespecífica entre os machos de *H. erato*, o que nos leva a questionar se alguns indivíduos teriam um padrão de coloração que aumenta seu sucesso reprodutivo através de escolha preferencial pelas fêmeas.

A comparação do tamanho dos elementos da coloração entre machos e fêmeas revelou um dimorfismo sexual em ambas as espécies. Em *H. erato*, três dos quatro elementos medidos são maiores em machos, sendo o vermelho dorsal o único que não varia. Em *H. besckei*, novamente três elementos são maiores nos machos, mas o que não

varia é o vermelho ventral. O padrão de variação encontrado sugere um processo de seleção sexual sobre estes sinais nos machos e restrições evolutivas para a modificação de uma das manchas. A diferença de dimorfismo entre as espécies pode ser resultado de suas peculiaridades comportamentais e fisiológicas – diferenças no ritual de corte, nas posturas de defesa ou nas necessidades de termorregulação, por exemplo.

Seleção sexual e isolamento reprodutivo em *H. erato phyllis* e *H. besckei*

Nas borboletas *Heliconius* os padrões de coloração foram certamente moldados por mais de uma pressão seletiva: seleção natural para aposematismo e mimetismo mülleriano (Benson 1972), levando à convergência de fenótipos; seleção natural para isolamento reprodutivo reforçado por seleção sexual, quando o surgimento de um novo padrão é acompanhado da preferência por ele e o isolamento é pré-copulatório (Mavárez *et al.* 2006) ou quando híbridos têm um padrão de coloração desfavorecido e o isolamento é pós-copulatório (McMillan *et al.* 1997, Jiggins *et al.* 2001, Jiggins *et al.* 2004); além dos fatores relacionados à termorregulação (Lutz e Araújo, submetido).

Há pelo menos duas narrativas históricas plausíveis para o surgimento de espécies miméticas próximas filogeneticamente (Giraldo *et al.* 2008): 1) a divergência no padrão de cores leva ao isolamento reprodutivo e depois se dá a convergência fenotípica por seleção para o mimetismo; ou 2) a divergência em outras características (p.ex. hábitat ou feromônios) leva à especiação sem que ocorra divergência no padrão de cores, mantido pela seleção para mimetismo. A explicação mais convencional, principalmente quando as espécies se encontram em clados diferentes dentro do gênero, como é o caso de *H. erato phyllis* e *H. besckei*, é a primeira. Se a especiação não se deu por adaptação ecológica, mas

sim por divergência do padrão de cores, e posteriormente este padrão convergiu novamente, é possível que os mecanismos de isolamento sexual apresentem falhas. O mimetismo, assim, pode implicar em custos para o reconhecimento específico nas regiões de simpatria.

Heliconius erato phyllis habita áreas com ou sem a ocorrência de *H. besckei*. A presença de seu mímico pode significar a existência de um sinal de interferência na comunicação intraespecífica e, portanto, uma pressão seletiva a mais sobre as características envolvidas no isolamento reprodutivo. Estas características podem ser a coloração das asas, os feromônios, o ritual de corte, os horários com pico de atividade sexual ou a ocupação de micro-habitats, por exemplo. A abundância relativa de ambas as espécies em áreas de simpatria e sua distribuição espacial também pode ser influenciada pelos custos da coexistência (Gröning e Hochkirch 2008). Hipóteses de reforço do isolamento reprodutivo causado por interferência sexual entre estas espécies, contudo, precisam ser verificadas em trabalhos futuros, separadamente.

O dimorfismo sexual encontrado nas duas espécies deste estudo nos leva a questionar o quanto este tipo de variação é difundido dentro do gênero. Existe um único caso conhecido de dicromatismo sexual em *Heliconius*, na espécie *H. nattereri*, onde as fêmeas mimetizam um padrão encontrado no grupo silvaniforme (p.ex. *H. ethilla*) e os machos apresentam um padrão acentuadamente distinto (Brown 1972). A importância das cores no contexto sexual tem sido bem explorada no que diz respeito ao reconhecimento específico pelos machos, mas faltam estudos que tratem das pressões seletivas exercidas pelas fêmeas; incluindo a possibilidade de o mimetismo atuar como restrição para os resultados desse processo. A seleção sexual epigâmica pode ser um fator adicional dentro da rede de pressões seletivas já conhecidas que atuam sobre a coloração das asas de *Heliconius*.

Considerações finais e perspectivas

Os resultados deste estudo abriram novas questões que podem ser convertidas em hipóteses testáveis. A metodologia utilizada na abordagem comportamental se mostrou bastante eficiente e novos experimentos podem ser feitos através dela. Por dificuldades que encontramos na criação de *H. besckei*, não foi possível a construção de modelos para realizar os testes de função das cores, sendo este um trabalho ainda a ser executado. Com este método também se pretende comparar a atratividade de um modelo coespecífico contra um heteroespecífico no mesmo par mimético. Este experimento poderá avaliar mais precisamente a eficiência da discriminação específica por meios visuais. O método usado na montagem das amostras de espectrofotometria é original deste trabalho e também pode ser usado em análises futuras. A diferença interespecífica no ultravioleta deve ser mais aprofundada utilizando-se um maior tamanho amostral, incluindo *H. besckei* proveniente de laboratório; e a variação intraespecífica em *H. erato* pode ser explorada pela análise de indivíduos irmãos daqueles que apresentaram um padrão de reflectância discrepante.

Estudos genéticos e populacionais também têm muito a contribuir com o entendimento dos processos que levaram ao surgimento dos padrões relacionados à coloração e ao isolamento reprodutivo de *H. erato phyllis* e *H. besckei*. A análise da herdabilidade e plasticidade fenotípica das manchas das asas e a caracterização e evolução molecular dos pigmentos ultravioleta podem ser promissores. Já estudos populacionais podem tratar dos temas discutidos acima sobre simpatria e alopatria. Por fim, trabalhos futuros poderão incluir novas espécies, como *H. melpomene nanna*, que compartilha o padrão de coloração das duas acima, e *H. ethilla*, espécie irmã de *H. melpomene* e *H. besckei*, mas pertencente a outro anel mimético.

REFERÊNCIAS

- Bates, H. W. 1862. Contributions to na insect fauna of the Amazon valley: Lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc. Lond.* **23**: 495-566.
- Beltrán, M., Jiggins, C. D., Brower, A. V. Z., Bermingham, E. e Mallet, M. 2007. Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biol. J. Linn. Soci.* **29**: 221-239.
- Brown, J. L. 1975. *The Evolution of Behavior*. W. W. Norton, New York. 761 p.
- Brown, K. S. 1979. *Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais*. Unicamp, Campinas. Tese de doutorado.
- Crane, J. 1955. Imaginal behavior of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydara* Hewitson, with special reference to the social use of color. *Zoologica* **40**: 167-196.
- Danchin, É e Cézilli, F. 2008. Sexual Selection: Another Evolutionary Process. In: *Behavioural Ecology* (Danchin, É., Giraldeau, L. e Cézilly, F. org.) Oxford univ. press. 874 p.
- Deinert, E. I. 2003. Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In Boggs, C. L., Watt, W. B. e Ehrlich, P. R. (eds.). *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 91-108.
- Emsley, M. G. (1970). An observation on the use of color for species recognition in *Heliconius besckei* (Nymphalidae). *J. Lepid. Soc.* **24**: 25.
- Estrada, C., Yildizhan, S., Schulz, S. e Gilbert, L. E. (2009). Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. *Proc. R. Soc.B.* **277**(1680):407-413.

- Freeman, S. e Herron, J. C. 2001. *Evolutionary Analysis*. 2nd ed. Prentice-Hall, New Jersey. 704 p.
- Gilbert, L. E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: patterns, process, and problems. In: *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions* (Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, T. W. e Benson, W. W. eds.). John Willey & sons, New York. pp. 403-427.
- Giraldo, N., Salazar, C., Jiggins, C. D., Bermingham, E. e Linares, M. 2008. Two sisters in the same dress: *Heliconius* cryptic species. *BMC Evol. Biol.* **8**: 324.
- Gröning, J. e Hochkirch, A. 2008. Reproductive interference between animal species. *Quart. Rev. Biol.* **83** (3): 257-282.
- Hoskin, C. J. e Higgin, M. 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters* **13**: 409-420.
- Jiggins, C. D., Estrada, C. e Rodrigues, A. 2004. Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconius melpomene* Linnaeus. *J. Evol. Biol.* **17**: 680-691.
- Jiggins, C. D., Naisbit, R. E., Coe, R. L. e Mallet, J. 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*. **411**: 302-305.
- Kronforst, M. R., Young, L. G., Kapan, D. D., MacNeely, C., O'Neill, R. J. e Gilbert, L. E. 2006. Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 6575-6580.
- Lutz, L. V. e Araújo, A. M. Effects of wing colour pattern and position at communal roost on daily budget in *Heliconius erato phyllis* Fabricius, 1775 (Lepidoptera; Nymphalidae). Artigo submetido.

- Mavárez, J. Salazar, C. A., Birmingham, E., Salcedo, C., Jiggins, C. e Linares, M. 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature* **441**: 868-871.
- Mayr, E. 1977. *Populações, espécies e evolução*. Cia. Editora Nacional, São Paulo. 485 p.
- McMillan, W. O., Jiggins, C. D. e Mallet, J. 1997. What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 8628-8633.
- Müller, F. 1879. *Ituna* and *Thyridia*; a remarkable case of mimicry in butterflies. *Trans. Entomol. Soc. Lond.* **1879**: xx-xxix.
- Ridley, M. 2004. *Evolução*. 3a ed. Artmed, Porto Alegre. 752 p.
- Ryan, M. J. e Rand, A. S. 1993. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* **47**(2): 647-657.
- Ryan, M. J. 1998. Sexual Selection, Receiver Biases, and the Evolution of Sex Differences. *Science* **281**: 1999-2003.
- Scoble, M. J. 1992. *The lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford univ. press, New York. 404 p.
- Silberglied, R. E. 1984. Visual communication and sexual selection among butterflies. In Vane-Wright, R. I. e Ackery, P. R. (eds.). *The Biology of Butterflies*, Academic, London, pp. 207-223.
- Turner, J. R. G. 1981. Adaptation and evolution in *Heliconius*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **12**: 99-121.
- Vane-Wright, R. I. e Boppré, M. 1993. Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **340**: 197-205.
- Wallace, A. R. 1889. *Darwinism. An Exposition of the Theory of Natural Selection*. London: Macmillan.