

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Dimorfismo sexual e reconhecimento de parceiros em
***Heliconius ethilla narcaea* (Lepidoptera, Nymphalidae).**

Aluno: Marcelo Carvalho Costa

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientador: André Luis Klein

Trabalho apresentado como requisito
para obtenção do grau de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

Redigido segundo as normas da revista *Journal of Insect Behavior* (em anexo)

Título: Dimorfismo sexual e reconhecimento de parceiros em *Heliconius ethilla narcaea* (Lepidoptera, Nymphalidae)

Marcelo Carvalho Costa, 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 3316-7311.

E-mail: aldo1806@gmail.com

Email de Marcelo Carvalho Costa: costa.celo@gmail.com

Resumo

Este trabalho descreve um dimorfismo sexual na coloração de *Heliconius ethilla narcaea*, um caso intermediário de diferença entre machos e fêmeas em um gênero classicamente conhecido por formar anéis miméticos baseados em coloração aposemática e que apresenta poucos casos descritos de diferenças entre os sexos. Caracterizamos este dimorfismo qualitativa e quantitativamente através de análises de imagens das asas e testamos experimentalmente a importância desta variação para o reconhecimento de parceiros pelos machos. Também foi testado se há dimorfismo no comprimento de onda das três cores que compõem o padrão das asas em questão através de espectrofotometria. Os machos são capazes de discernir entre os sexos utilizando-se apenas do padrão de coloração dimórfico e esta diferença se limita à disposição das manchas e quantidade de diferentes pigmentos. As cores não diferiram no seu padrão de comprimento de onda. Estes resultados somam à já conhecida função de reconhecimento específico para a coloração de *Heliconius* também seu uso no reconhecimento sexual de parceiros.

Palavras-chave: dimorfismo sexual, reconhecimento de parceiro, borboletas, *Heliconius ethilla narcaea*, mimetismo.

Introdução

Dimorfismo Sexual é o nome que se dá às diferenças entre machos e fêmeas de dada espécie para as características sexuais secundárias. Essas diferenças são recorrentes na natureza, e aparecem nos mais diversos grupos de animais, tendo servido como ponto de partida para Darwin elaborar e defender sua teoria da seleção sexual (Darwin 1871). Em borboletas, apesar de ser a exceção (Rutowski 1997), existem casos relatados de dimorfismo para caracteres morfológicos, como para o tamanho corporal (Haag & Araújo 1994) e coloração, sendo estes últimos os mais conhecidos.

A variação intersexual na coloração – dicromatismo sexual – é fartamente conhecida no grupo (p. ex. *Doxocopa* spp., *Heraclides* spp., *Morpho* spp. e *Papilio* spp. – ver Canals 2003). As cores e padrões das asas se mostram muito importantes no processo de corte desses animais que, apesar de ser complexo e envolver inúmeros passos, incluídos aí, entre outros, sinais químicos e de toque de asas e de probóscide (Klein & Araújo 2010), inicia-se, em grande parte das espécies, mediada por canais visuais (Silberglied 1984; Vane-Wright & Boppre 1993). Os machos localizam e reconhecem potenciais parceiras baseados, sobretudo, em características morfológicas observáveis à distância. Sobre o assunto, segundo Rutowski (1991): “Não é conhecido nenhum sinal químico produzido por [borboletas] fêmeas que atraia ou afete o comportamento de machos a uma distância de mais de alguns centímetros”, “Ao invés disso, os machos de borboletas tipicamente localizam fêmeas ao procurar por elas, tanto enquanto eles voam [*patrolling*] ou conforme sentam e esperam [*perching*] em lugares onde elas costumam aparecer”.

Contudo, apesar da função sexual das cores em lepidópteros ser notadamente importante, ela não é a única. Como sintetiza Scoble (1992), as cores são importantes para a comunicação, mas também para a proteção (antipredatória) e para a

termorregulação. Cabe salientar, entretanto, que essas funções podem se mostrar conflitantes, como, por exemplo, no caso das borboletas do gênero *Heliconius*.

As borboletas *Heliconius* (Nymphalidae, Heliconiinae) perfazem um grupo de cerca de 40 espécies, algumas das quais possuem ainda mais diversidade fenotípica por apresentarem dezenas de subespécies. Estas são borboletas são impalatáveis, com cada subespécie apresentando um padrão próprio de coloração nas asas. Espécies e subespécies de *Heliconius* apresentam, em sua maioria, padrões de coloração compostos por áreas grandes e regulares de preto, além de outras cores brilhantes. Há uma planta baixa base para a origem e a migração das manchas em ninfalídeos e, a partir desse padrão, diferenciou-se a planta base para os padrões de manchas em *Heliconius. spp.* (Nijhout & Wray 1988) (Fig. 1).

Tais padrões são fortemente envolvidos no reconhecimento de parceiros, tendo por isso um papel fundamental no isolamento reprodutivo (Jiggins et al. 2001; McMillan 1997). Contudo, esse grupo é grandemente conhecido pelos anéis miméticos que forma com outras espécies que ocorram na mesma localidade (Brower et al. 1963). Portanto, o potencial conflito de funções acontece porque, diferente da maioria das outras borboletas, as *Heliconius* têm ainda a pressão de, quando procuram parceiros, diferenciar comímicos de coespecíficos (Estrada & Jiggins 2008). O mimetismo, que tem uma função protetora, gera a convergência interespecífica de sinais de comunicação, enquanto que a seleção para o reconhecimento específico deve favorecer sinais cada vez mais conspícuos para a espécie (Silberglied 1984).

Uma forma de contornar tal conflito e garantir a eficiência no reconhecimento visual intraespecífico seria utilizar-se de diferenças sutis na coloração, tanto no espectro de cor visível quanto naquilo a que Silberglied (1979; 1984) se referiu como um “canal

privado” de comunicação entre coespecíficos, que passaria despercebido pelos predadores: os comprimentos de onda na faixa do ultravioleta.

O gênero *Heliconius* apresenta genes duplicados para a expressão das opsinas UVRh, o que resulta em dois pigmentos visuais sensíveis à luz ultravioleta (UV), com picos de sensibilidade próximos a 398 e 355 nm, diferentemente das demais borboletas, que possuem apenas o primeiro. O novo pico de sensibilidade ao UV surgido no gênero coincide com o que é refletido pelo pigmento amarelo das asas, 3-OHK, diferente do pigmento para esta cor em não-heliconíneos. Este sistema sinal-receptor, portanto, provavelmente evoluiu no gênero como mecanismo de discriminação entre potenciais parceiros e seus cómicos (Briscoe et al. 2010; Bybee et al. 2012).

Além do potencial conflito com o reconhecimento específico, o mimetismo também pode ser uma restrição para a evolução de qualquer diferença entre os sexos no padrão de coloração, uma vez que isto implicaria em algum grau de desconfiguração do fenótipo que confere a proteção anti-predatória. Desta forma, uma possível seleção disruptiva entre os sexos para a coloração seria contrabalanceada pela seleção estabilizadora para o mimetismo (Allen 2011).

Apesar disso, em *Heliconius nattereri*, espécie "criticamente ameaçada" (IUCN Red List 1996) e que é restrita a pequenas localidades nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (Brown Jr 1979), machos e fêmeas apresentam padrões extremamente distintos. Esta espécie, o único caso de dicromatismo descrito no gênero, apresenta coloração pertencente ao anel mimético de padrão tigrado limitado às fêmeas, bem diferente daquele encontrado nos machos (Brown 1972 apud Brown 1979). De forma muito mais sutil e apenas quantitativa, *H. erato phyllis* e *H. besckei* possuem algumas das manchas das asas maiores em machos (Klein & Araújo 2013).

Observações pessoais e relatos (Klein, comunicação pessoal), no entanto, constataram um dimorfismo sexual muito mais sutil, porém consistente, na espécie-irmã de *Heliconius nattereri*, mais precisamente na subespécie *H. ethilla narcaea* (Fig.2), que ocorre no sul, sudeste e centro-oeste do país. A diferença entre os sexos nesta subespécie se dá principalmente na proporção de preto das asas, e pode ser considerada um grau intermediário entre o que se encontra na maior parte do gênero (monomorfismo) e o caso da sua espécie-irmã. A compreensão da evolução deste padrão em *H. ethilla narcaea*, portanto, é de fundamental importância para se elucidar os processos que podem ter favorecido ou limitado o surgimento do dimorfismo sexual no gênero *Heliconius*.

Uma vez que o dimorfismo sexual em questão não está devidamente descrito na literatura científica, estabeleceu-se como primeiro objetivo deste projeto (1) caracterizar quantitativa e qualitativamente o dimorfismo sexual de *Heliconius ethilla narcaea*. Como primeira abordagem na investigação das possíveis importâncias ecológicas deste dimorfismo, consiste no segundo objetivo, (2) avaliar a importância da variação em questão como critério para o reconhecimento de parceiros (discriminação sexual) em *Heliconius ethilla narcaea*, além de (3) procurar possíveis dimorfismos sexuais no padrão de reflectância, principalmente no espectro ultravioleta.

Materiais e Métodos

Para incidir sobre os objetivos derivados das perguntas levantadas, foi necessária a coleta de animais em campo, bem como a sua criação em laboratório, além da realização de experimentos distintos, explicados a seguir:

Captura e criação das borboletas

Indivíduos foram capturados em saídas de campo nos municípios gaúchos de Porto Alegre (30° 4'30.56"S; 51° 6'50.60" O), Viamão (30° 5'17.48"S; 51° 1'25.79" O) e São Francisco de Paula (29°26'28.17"S; 50°36'47.91" O), além do município paranaense de Paula Freitas (26°11'36.77"S; 50°55'26.56" O). Os animais coletados fora da cidade de Porto Alegre foram transportados em caixas confeccionadas com telado e colocadas dentro de bolsas térmicas refrigeradas para indução de dormência, visando à diminuição do estresse durante o transporte. Uma vez trazidos para o laboratório foram primeiramente marcados para fins de controle de procedência e, em seguida, alocados em viveiros de criação que se encontram nos arredores do Departamento de Genética da UFRGS.

Os viveiros de criação têm condições semi-naturais. Os animais dispunham de plantas hospedeiras e alimentação *ad libitum* à base de água, mel e pólen, e que era repostada diariamente, pela manhã, em alimentadores artificiais. Os ovos postos pelas fêmeas em ramos de *Passiflora caerulea* disponibilizados nos viveiros eram coletados diariamente, levados ao laboratório e criados coletivamente em caixas de vidro contendo ramos da planta hospedeira e um substrato de algodão e papel úmidos, em câmara de criação (tipo B.O.D) com fotoperíodo e temperatura controlados.

Os viveiros são divididos em compartimentos de aproximadamente 2,5x3x3m, o que permite a separação dos indivíduos conforme as necessidades.

Descrição qualitativa do padrão de coloração

Fez-se uma análise visual minuciosa no conjunto amostral visando descrever as diferenças mais consistentes encontradas entre os sexos.

Comparação quantitativa da proporção de cores nas asas entre os sexos

Borboletas recém-emergidas foram mortas por congelamento e tiveram suas asas dissecadas. A asa anterior e posterior de um dos lados foram digitalizadas na vista dorsal e ventral em um escâner de mesa Epson, modelo Stylus TX105, em uma escala de 118 pixels/cm em uma resolução de 300dpi.

Utilizando-se do *software* livre *ImageJ* VERSÃO 1.47, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, gerou-se um histograma de “número de pixels” vs. “tipo de pixel” (cores transformadas para uma escala de cinza) para cada asa. Os valores foram posteriormente normalizados para excluir efeitos de escala.

Foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCOA) de forma a quantificar a relação entre a variável medida (proporção de cores) e os grupos (sexo).

Experimento comportamental

A metodologia desta etapa foi adaptada de Jiggins et al. (2001) e Jiggins (comunicação via e-mail), já tendo sido utilizada com sucesso para outras duas espécies em nosso grupo de pesquisa (Klein & Araújo 2010b, dissertação de mestrado).

Montou-se um modelo de macho e um de fêmea a partir de asas de indivíduos recém-emergidos criados em laboratório. Para tanto os animais foram mortos por congelamento, tiveram suas asas dissecadas e imersas em hexano pelo período de 1 hora para a eliminação de possíveis compostos químicos voláteis, como feromônios. Posteriormente, foram colados à base das asas pequenos paralelogramos de papel cartão de 8x4 mm, os quais foram unidos um ao outro por uma tira estreita de fita adesiva, mantendo um espaço de 8 mm entre o lado direito e o esquerdo. A estrutura foi colada a um canudo plástico de 25 mm de comprimento, que ficou onde estaria o corpo da borboleta, mantendo as asas equidistantes do canudo. Excetuando-se as asas, os outros componentes utilizados para montar o modelo foram pintados de preto com marcador permanente para retroprojeter. (Fig.3)

Os modelos eram apresentados simultaneamente a um grupo de machos no viveiro, fixados a uma armação de arame e PVC previamente instalada. No centro de cada uma de duas áreas esféricas de 50 cm de diâmetro, distantes 50 cm uma da outra, eram colocados os modelos para teste. Essa estrutura podia ser manipulada através de

um barbante, fazendo com que os modelos movimentassem suas asas, aumentando assim a atratividade para os machos (Fig.4).

O experimento consistia no registro das atividades de um grupo de machos (3-4 machos/grupo) quando interagindo com os modelos, sendo contabilizados dois tipos diferentes de comportamento: *aproximação* – toda vez que um macho entrava na área demarcada; e *inspeção* – vôo sustentado direcionado para o modelo. Foram testados 3 grupos de machos.

Cada sessão experimental tinha a duração de 20 minutos, sendo feitas no máximo duas por dia, com intervalos de pelo menos 20 minutos entre elas. Nelas os machos eram apresentados a dois modelos co-específicos simultaneamente: um modelo de fêmea e um de macho.

Os experimentos foram realizadas em viveiros em condições semi-naturais, em dias de sol, temperatura acima de 20°C e pouco vento, para machos ativos alimentados *ad libitum*. Foram realizados 8 testes. Os dados foram posteriormente comparados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Espectrofotometria

Foram medidas três cores: laranja, amarelo e branco, nas vistas ventral e dorsal, utilizando-se de amostras extraídas de regiões das asas anteriores (branco, vistas ventral e dorsal) e posteriores (laranja e amarelo, vistas ventral e dorsal). Cada amostra foi colada com fita adesiva preta sobre uma lâmina de vidro e, por cima dela, outra fita adesiva preta foi colada, sendo que esta tinha um orifício quadrado de 3 mm de lado.

Para a coleta dos dados de refletância a lâmina era posicionada dentro do espectrofotômetro, o qual tinha o seu feixe de luz delimitado por um orifício circular de 2 mm de diâmetro, direcionado para a área exposta da amostra (fig.5). Foi realizada espectrofotometria difusa em um espectrofotômetro modelo Cary 5000 UV-Vis-NIR (Laboratório de Laser e Ótica – Instituto de Física, UFRGS). Foram amostrados três indivíduos de cada sexo, provenientes de laboratório e sacrificados imediatamente após a emergência, garantindo assim que as asas se mantivessem intactas.

Resultados

Descrição qualitativa dos padrões de coloração

O padrão das asas anteriores na vista dorsal (Fig.7) é composto por uma grande proporção de preto que ocupa a metade distal da asa, até próximo da veia Cu_2 (Fig.6). Ainda na porção mais distal há uma pequena mancha branca arredondada cortada pelas veias R_4 e R_5 . Na região central da asa há uma banda amarela que atravessa aproximadamente três quartos da mesma no sentido transversal. Da extremidade proximal da asa saem três bandas de cor preta contra uma coloração laranja de fundo, sendo a banda mais próxima à Sc contínua com o resto da coloração preta da asa. Na margem posterior da asa, adjacente a uma das bandas pretas, há uma delgada banda laranja.

A variação nesta asa que se mostrou consistente entre machos e fêmeas amostrados se deu na grande área proximal pigmentada por laranja. Enquanto que esta

mancha é contínua com a amarela nos machos, nas fêmeas há uma área de coloração preta substituindo o que é laranja em machos e resultando na descontinuidade entre as duas manchas coloridas neste sexo.

A asa posterior, em sua vista dorsal, apresenta uma banda amarela, centralizada, que percorre, a partir da base, aproximadamente quatro quintos da extensão da asa. Circundando essa banda há uma mancha contínua, aproximadamente da mesma largura, de cor preta. Há uma banda laranja na mesma orientação da banda amarela, e aproximadamente de mesma extensão, separada da mesma pela mancha preta que a circunda. A margem posterior da asa é preenchida por preto, desde A_{1+2} até a parte distal de $Sc + R_1$. Há uma banda laranja nesta mesma extensão, porém não adjacente nem à margem posterior da asa nem à banda amarela já descrita acima (está circundada de preto).

A variação nesta asa que se mostrou consistente entre os machos e fêmeas amostrados se deu principalmente no local correspondente à posição das androcônias em machos. Nesse sexo essa região, acinzentada, é praticamente adjacente à banda amarela, havendo uma área extremamente delgada de preto entre elas. Já nas fêmeas a margem anterior da asa é preenchida por laranja e, entre esta e a banda amarela há uma banda preta. Também é notável a diferença na largura da banda amarela, maior em machos, principalmente na parte mais distal.

Comparação quantitativa das proporções de cores entre fêmeas e machos.

O resultado da PCOA para coloração da face dorsal da asa anterior mostrou que mais de 94% da variação encontrada nas amostras pode ser explicada pelas duas coordenadas principais (PCOA1 67,647%, PCOA2 26,639%). Para a face ventral da mesma asa os resultados foram de 60,293% (PCOA1) e 18,462% (PCOA2), totalizando mais de 78% de explicação.

As análises de coordenadas principais para a asa posterior foram de 60,446% (PCOA1) e de 22,698% (PCOA2) para a face dorsal (~84%) e de 65% (PCOA1 45,856%, PCOA2 19,26%) para a face ventral. (Tabela 1, Fig. 8)

A plotagem dos pontos representativos dos indivíduos não mostrou nenhuma grande diferença entre machos e fêmeas, porém, nas Fig.8^a e 8c, nota-se um pequeno padrão de agrupamento de machos e fêmeas.

Os histogramas médios formados pelas contagens de pixels da escala de cinza, conforme seria o esperado, apresentaram picos correspondentes às quatro cores presentes nas asas de *Heliconius ethilla narcaea*, o que nos permite inferir sobre a posição aproximada das cores nessa escala e comparar as proporções de cada cor entre machos e fêmeas. Assim, no sentido da esquerda para a direita, os picos representam, respectivamente, as cores preto, laranja, amarelo e branco.

Na face dorsal da asa anterior (Fig. 10a), o pico correspondente ao laranja é maior em machos e o correspondente ao preto é maior em fêmeas, o que complementa a nossa análise qualitativa do dimorfismo. O mesmo padrão se apresenta, embora de forma não tão clara, na face ventral da mesma asa (Fig. 10b)

Na face dorsal da asa posterior novamente os machos apresentaram maior proporção de laranja, enquanto que as fêmeas mostraram-se mais pretas. Somado a essas diferenças, há uma diferença na área do amarelo, sendo que machos apresentam

essa cor em maior quantidade e mais clara (Fig. 10c). Na face ventral da asa posterior as curvas são mais justapostas.

Reconhecimento de parceiros

A *aproximação* dos machos aos modelos de fêmea (média \pm DP: $6 \pm 5,88$) e de macho (média \pm DP: $2,125 \pm 0,99$) não diferiu significativamente ($W=25$; $p=0,085$). Já a *inspeção* foi maior quando direcionada ao modelo de fêmea (média \pm DP: $8,25 \pm 4,68$) do que ao de macho (média \pm DP: $1,625 \pm 1,77$) ($W=36$; $p=0,012$). (Tabela 2, Fig. 9).

Os modelos, no total, estimularam mais *inspeções* do que *aproximações* pelos machos. O que indica que são, de fato, boas representações de indivíduos, estimulando o comportamento que indica o início do cortejo (Tabela 2).

Comprimento de onda das cores

O padrão geral das curvas de reflectância não diferiu entre os sexos, tanto na faixa visível quanto na ultravioleta. A única diferença consistente entre os sexos se dá na porcentagem de reflectância do laranja e do amarelo na face dorsal, que são maiores (cores mais intensas) em machos (Fig. 11).

Há um leve acive representativo de reflectância por volta de 350 nm, mas não se nota uma diferença consistente entre machos e fêmeas.

Esse mesmo acive no comprimento de onda de 350 nm aparece nos gráficos para a reflectância da cor amarela, sendo maior nas amostras coletadas no amarelo ventral. Além disso, há indício de reflectância na região dos 250 nm.

A curva de reflectância das amostras de cor branca também não difere entre machos e fêmeas. Além disso, ressalta-se o grande pico na frequência UV de 250 nm, consistente nas amostras, mas igual em machos e fêmeas.

Discussão

O dimorfismo sexual de *H. ethilla narcaea*, de acordo com nossas análises, se dá em duas propriedades do padrão de coloração das asas: 1) a disposição (e, portanto a adjacência) das diferentes cores das manchas e 2) a quantidade relativa de cada tipo de pigmento. A natureza das cores (comprimento de onda), por sua vez, não se encaixa nesse padrão de variação. Descarta-se, assim, o ultravioleta como critério de reconhecimento sexual de parceiros nesta espécie, limitando-se esse sinal à sua função mais generalizada e conhecida na literatura: o reconhecimento específico.

Uma vez excluídas diferenças no ultravioleta, nossos resultados comportamentais podem ser diretamente relacionados às duas propriedades do dimorfismo no padrão de coloração das asas (adjacência de manchas e quantidade de pigmentos).

O reconhecimento visual de parceiros em *H. ethilla narcaea*

O reconhecimento de parceiros em borboletas pode ser abordado como sendo composto por pelo menos três etapas de discriminação: 1) entre coespecíficos e heteroespecíficos; 2) entre os sexos; e 3) entre parceiros receptivos e não receptivos. No que diz respeito ao primeiro deles, já está bem estabelecida na literatura a importância do padrão de coloração como critério utilizado pelos machos de *Heliconius*. O presente trabalho estende essa função das cores também para a segunda etapa de reconhecimento (entre os sexos).

O cortejo equivocado – por exemplo, dirigido a indivíduos do mesmo sexo – representa um custo para ambos em termos de tempo e energia despendidos. Esta situação também implica que as fêmeas demorem mais a serem fecundadas, o que lhes reduz o tempo útil de oviposição. Portanto, o aumento na eficiência da discriminação sexual pelos machos traz uma vantagem adaptativa para ambos os sexos.

A comunicação sexual em animais pode se dar por diferentes vias sensoriais, incluídas aí a química dos feromônios, as visuais motoras (padrões de comportamento) e as visuais fixas, como forma, tamanho e coloração. Há, contudo, custos diferentes envolvidos na emissão e recepção de cada um desses sinais (Alcock 1983). O canal de comunicação química, por exemplo, requer a síntese recorrente de feromônios, estruturas especializadas para a sua emissão e, no sexo oposto, para a sua recepção e transdução. Padrões de movimento envolvem o gasto ativo de energia, além de serem, potencialmente, mais maleáveis – o que pode, nesse contexto, significar perda de informação. O principal custo na comunicação visual fixa, por sua vez, advém da sua produção – p. ex. a síntese de pigmentos, no caso das cores não estruturais. Outro custo se relaciona justamente com o fato de geralmente não serem renováveis: a perda de escamas em borboletas torna suas cores menos intensas, podendo, inclusive, haver

perda de componentes do sinal, como a reflectância em alguma faixa específica do espectro de luz (Klein et. al 2012, resumo de congresso).

A evolução do dimorfismo sexual no gênero em *Heliconius*

Conforme já desenvolvido na introdução, a evolução do dimorfismo sexual pode ser limitada pela seleção estabilizadora para a coloração defensiva do mimetismo. No dimorfismo de *Heliconius ethilla narcaea* nenhum dos sexos se afasta demasiado do padrão mimético. As espécies *Mechanitis lysimnia* e *Placidina euryanassa*, por exemplo, ocorrem em simpatria com *H. ethilla narcaea* em algumas regiões do Brasil e apresentam diferenças com esta mais marcantes do que as aqui descritas entre os sexos, sendo ainda assim consideradas como pertencentes ao mesmo padrão mimético.

Considerando que o amarelo dorsal da asa posterior dos machos é mais intenso e ocupa uma maior proporção da asa, e que um dimorfismo de tamanho no mesmo sentido também para a barra amarela da asa posterior de *H. erato phyllis* e de *H. besckei* já havia sido relatado (Klein & Araújo 2013), pode-se imaginar que as fêmeas exerçam algum tipo de escolha baseada nessa característica. O mesmo, no presente estudo, podendo ocorrer com a cor laranja dorsal das asas anteriores. São necessários, contudo, testes experimentais de escolha e manipulação de traços para cada caso particular.

O fato dos machos serem mais atraídos pelo modelo de fêmea, contudo, nos faz perguntar se, livres da pressão da seleção estabilizadora para o mimetismo, este dimorfismo não seria mais acentuado. A variação aqui descrita, nesse caso, poderia ser o resultado de uma preferência dos machos por determinados padrões de pigmentação,

porém limitado pela seleção natural. É importante salientar que não há respaldo para que se descarte a hipótese do dimorfismo ter surgido antes da preferência, e os machos terem, posteriormente, passado a utilizá-lo como critério de reconhecimento sexual.

Da mesma forma é possível que o dimorfismo de *H. ethilla narcaea* seja um subproduto de diferenças genéticas ligadas ao sexo, ou seja, sem significado funcional na sua origem. Se for esse o caso, deve-se perguntar o porquê da predominância do monomorfismo no gênero. Levando-se em conta que o único outro caso conhecido de dimorfismo no grupo ocorre na espécie-irmã desta aqui abordada, *H. nattereri*, é razoável hipotetizar que houve um relaxamento das restrições evolutivas – p. ex. as impostas pela seleção estabilizadora – nesse clado.

Um dos efeitos ecológicos de uma variação na proporção de preto nas asas é a sua potencial capacidade regulatória de temperatura. O aumento da proporção de preto em fêmeas deve implicar em maior eficiência no aquecimento corporal, sendo este, portanto, outro possível fator envolvido na evolução da diferença em questão.

Ao que toca o desenvolvimento das manchas em *Heliconius*, foram descritas, como colocado na introdução, plantas baixas para o que seria o padrão de coloração e migração das manchas (Nijhout 1988). Conhece-se, portanto, algo da importância de cada núcleo de mancha para a coloração total da asa (Nijhout 1991). Futuros estudos sob a ótica da biologia evolutiva do desenvolvimento podem revelar tanto restrições quanto facilitações para a evolução do tipo de padrão aqui investigado.

Análises de padrões biológicos de coloração que adotem uma abordagem focada na adjacência de diferentes manchas são promissoras para a compreensão dos processos evolutivos envolvidos. Tais métodos podem revelar novas estratégias adaptativas na evolução da diversidade mimética dentro do gênero *Heliconius* (Endler

2012). É possível que as combinações de adjacências de manchas difiram entre espécies comílicas para garantir o reconhecimento de parceiros, sem mudar o padrão geral aposemático relevante para os predadores.

Agradecimentos

Somos gratos aos integrantes do Laboratório de Genética Ecológica pelo auxílio na criação dos indivíduos utilizados neste estudo: Ana Carolina Bahi Aymone, Janaína De Nardin, Rosana Huff, Ana Silva, Luciana Silva, Bruna Missagia. Ao Marcelo Pereira e ao Flavio Horowitz do Laboratório de Laser e Ótica do Instituto de Física da UFRGS, pelas análises de espectrofotometria. Por fim, à Sídia M. Jacques-Callegari e ao André Luis Pereira Dresseno pelo suporte nas análises estatísticas.

Referências Bibliográficas

Alcock J, Thornhill R (1983) *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, USA.

Allen C (2011) Evolution of sexual dimorphism in the Lepidoptera. *Annual review of Entomology* 56:445-464

Briscoe AD, Bybee SM, Bernard GD, Yuan F, Sison-Mangus MP, Reed RD, Warren AD, Llorente-Bousquets J, Chiao CC (2010) Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius*

- butterflies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(8): 3628-33
- Brown Jr KS (1979) Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais. Unicamp - Campinas. Tese de Livre Docência
- Bybee SM, Yuan F, Ramstetter MD, Llorente-Bousquets J, Reed RD, Osorio D, Briscoe AD (2012) UV photoreceptors and UV-yellow wing pigments in Heliconius butterflies allow a color signal to serve both mimicry and intraspecific communication. The American Naturalist 179(1):38-51
- Canals GR (2003) Mariposas de Misiones; Butterflies of Misiones. Buenos Aires, Argentina(p.476). L.O.L.A.
- Darwin C (1871) A Origem do Homem e a Seleção Sexual (p.712). São Paulo, Brasil. Hemus
- Endler JA (2012) A framework for analysing colour pattern geometry: adjacent colours. Biological Journal of the Linnean Society 107:233-253
- Estrada C, Jiggins CD (2008) Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? Journal of evolutionary biology 21(3): 749-60
- Haag KL, Araújo AM (1994) Inbreeding, genetic load and morphometric variation in *Dryas iulia*. Revista Brasileira de Genética 17:35-39
- Jiggins C, Naisbit R., Coe R, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. Nature 411:302-305

- Klein AL, 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(3):409-420
- Klein AL, Araújo AM (2010b) Análise de coloração das asas no contexto sexual em um par mimético de borboletas *Heliconius*. Dissertação de mestrado.
- Klein AL, Araújo AM (2013) Sexual Size Dimorphism in the Color Pattern Elements of Two Mimetic *Heliconius* Butterflies. *Neotropical Entomology* 42(6)
- McMillan W (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16):8628–8633
- Nijhout HF, Wray GA (1988) Homologies in the color patterns of the genus *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 33:345-366
- Nijhout HF (1991) *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns* (p.297)
- Reed RD, Gilbert LE (2004) Wing venation and Distal-less expression in *Heliconius* butterfly wing pattern development. *Developmental genes and evolution* 214(12): 628–34
- Rutowski RL (1991) The evolution of male mate-locating behavior in butterflies. *American Naturalist*.
- Rutowski RL (1997) Sexual dimorphism, mating systems and ecology in butterflies. em *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*: 257–272

Scoble, M. J. (1992). The functions of colour in Lepidoptera. In *The Lepidoptera - Form, Function and Diversity* (pp. 77–88).

Silberglied RE (1979) Communication in the ultraviolet. *Ann. Rev. Ecol.* 18:76(131)

Silberglied RE (1984) Visual Communication and Sexual Selection Among Butterflies. In *The Biology of Butterflies - (Symposia of the Royal Entomological Society of London)*. London: Academic Press

Vane-Wright R, Boppre M (1993) Visual and chemical signalling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 340(1292): doi: 10.1098/rstb.1993.0058

World Conservation Monitoring Centre (1996) *Heliconius nattereri*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 25 November 2013.

ANEXOS

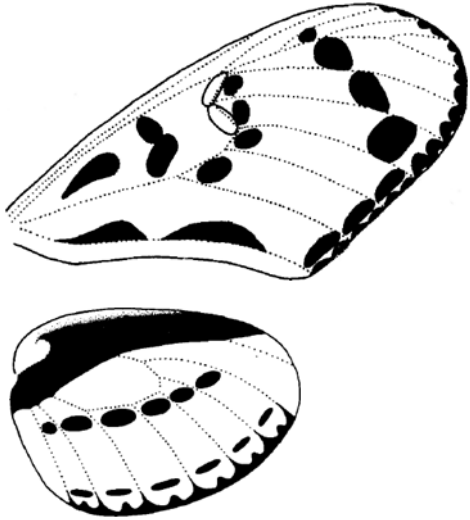


Fig. 1 Derivação do padrão de manchas de *Heliconius* a partir do grupo dos ninfalídeos (modificado de Nijhout & Wray, 1988).



Fig.2 *Heliconius ethilla narcaea*



Fig.3 Representação esquemática de modelo montado a partir de asas dissecadas

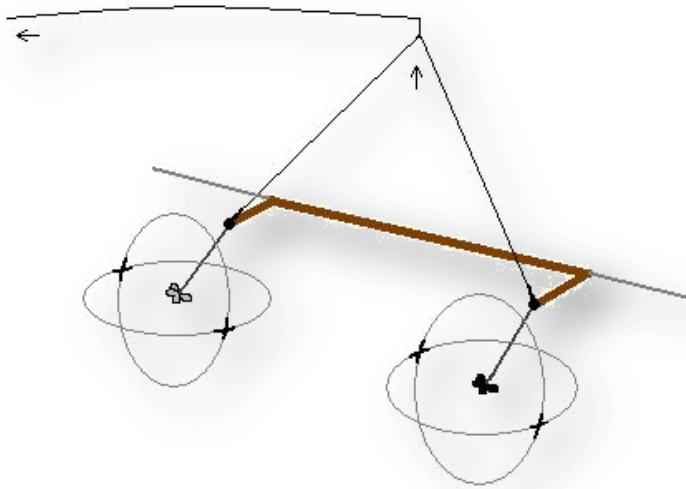


Fig.4 Aparato utilizado para experimentos comportamentais

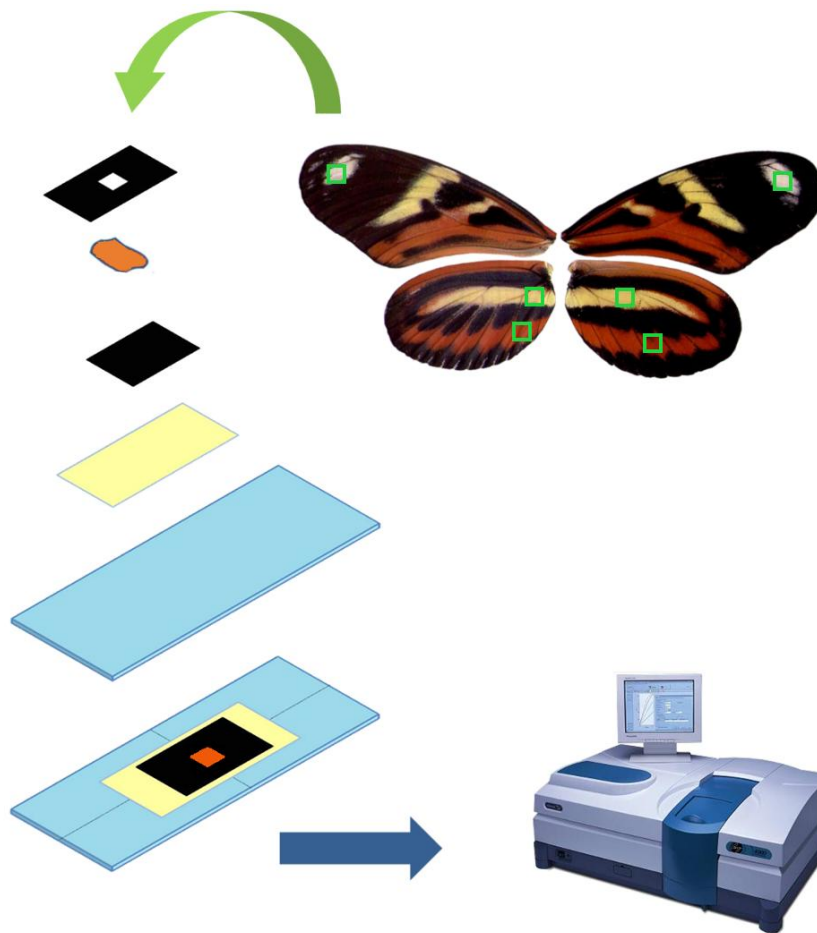


Fig.5 Passos para a montagem e área de extração de material para uso em espectrofotometria

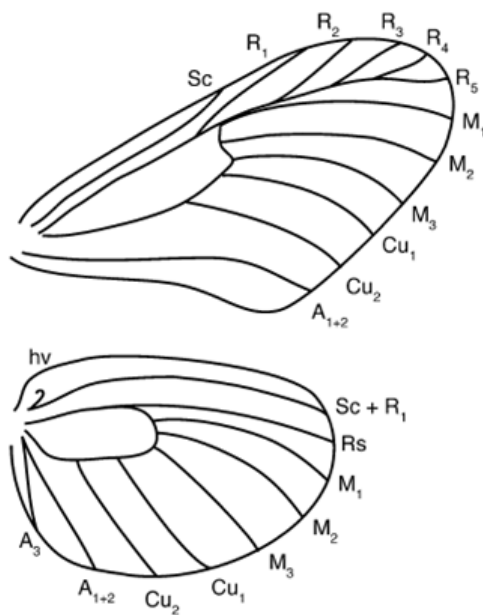


Fig.6 - Padrão de venação em *Heliconius* (modificado de Reed & Gilbert, 2004).

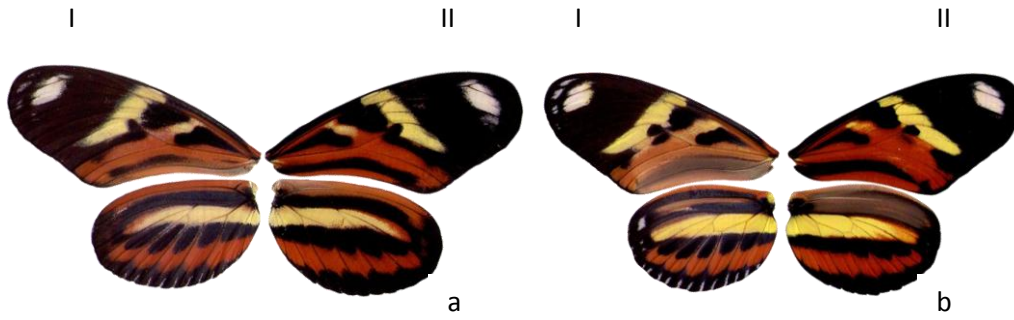


Fig.7- Asas anterior e posterior direitas de fêmea (a) e de macho (b) de *Heliconius ethilla narcaea*, vista ventral (I) e dorsal (II).

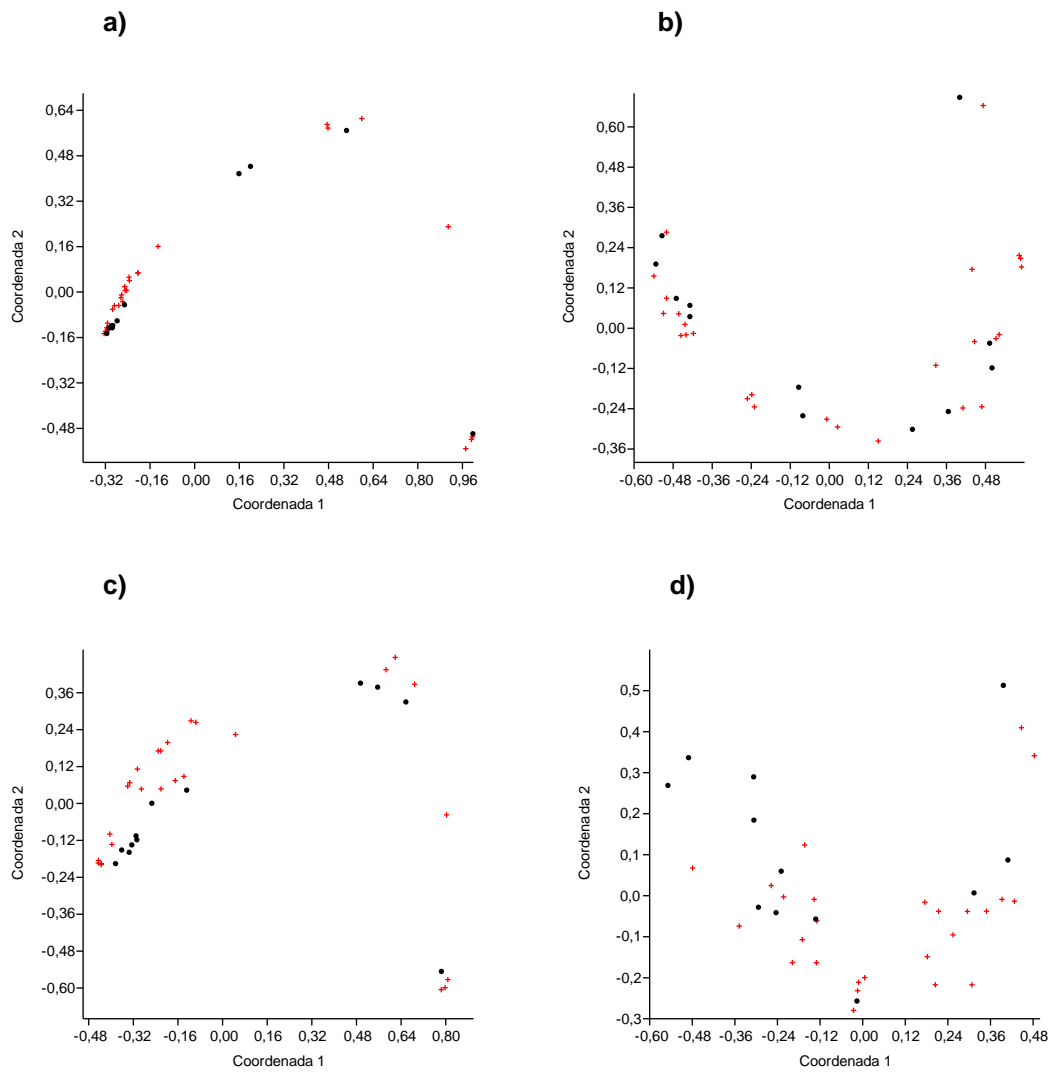


Fig. 8 Análise de Coordenadas Principais (distância de corda) a partir das matrizes de coloração das asas de machos (preto) e fêmeas (vermelho). a) Asa anterior, face dorsal; b) Asa anterior, face ventral; c) Asa posterior, face dorsal; d) Asa posterior, face ventral.

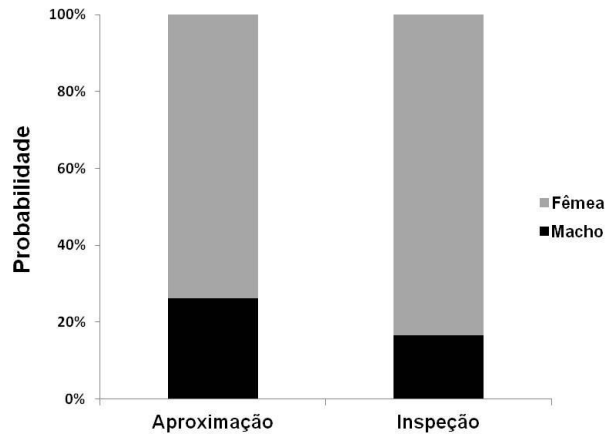


Fig. 9 Probabilidade de *aproximação* e *inspeção* de machos aos modelos de cada sexo em *Heliconius ethilla narcaea*.

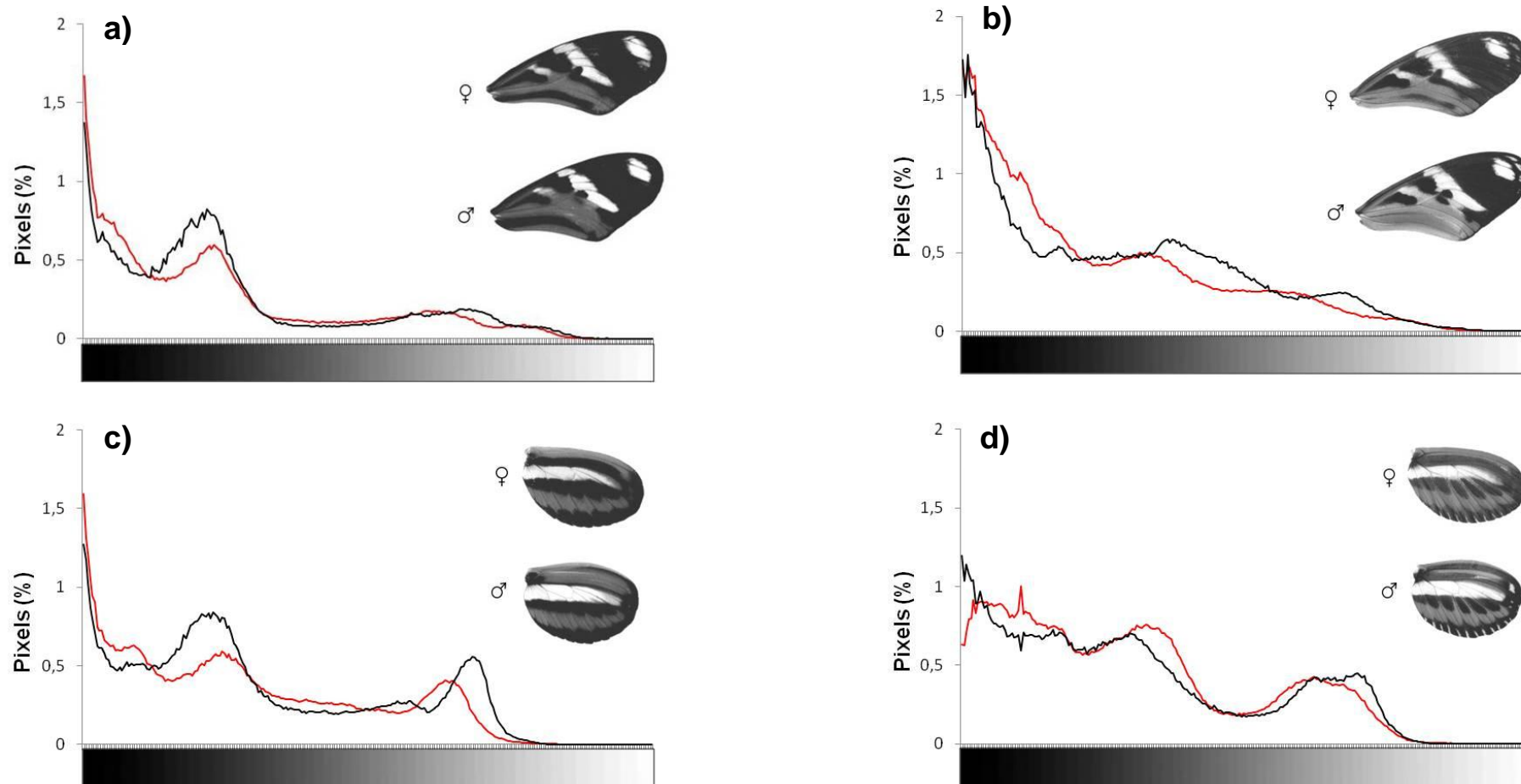


Fig. 10 Histogramas médios da contagem de pixels (%) para cada um dos 251 valores em uma escala de cinza. Linha preta: machos (n=12); linha vermelha: fêmeas (n=26). a) Asa anterior, face dorsal; b) Asa anterior, face ventral; c) Asa posterior, face dorsal; d) Asa posterior, face ventral.

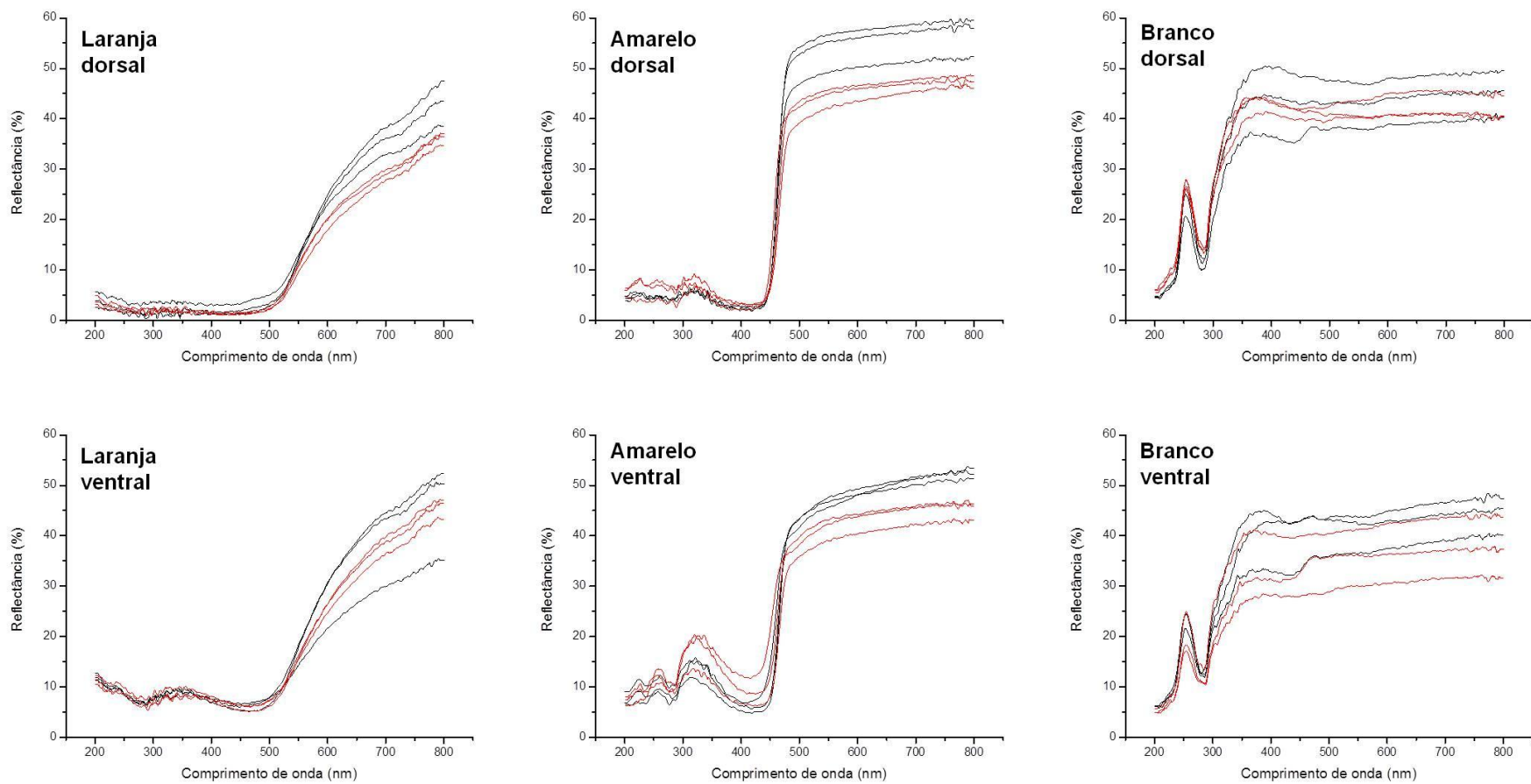


Fig. 11 Espectrofotogramas (reflectância difusa) das três cores que compõem as asas de *Heliconius ethilla narcaea*, para as faces dorsal e ventral. Linhas pretas: machos; linhas vermelhas: fêmeas.

Tabela 1 Valores percentuais do poder explicativo das coordenadas 1 e 2 para separar machos e fêmeas de acordo com a matriz de coloração por pixels.

	C1	C2
Anterior dorsal	67,647	26,639
Anterior ventral	60,293	18,462
Posterior dorsal	60,446	22,698
Posterior ventral	45,856	19,26

Tabela 2 Números absolutos de *aproximação* e *inspeção* de machos aos modelos de cada sexo. Cada linha representa um experimento e a última os valores totais.

Aproximação		Inspeção	
Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
17	3	17	1
3	3	4	0
2	1	9	0
5	3	6	2
3	1	12	3
0	2	8	5
5	1	8	2
13	3	2	0
48	17	66	13

