

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Mimetismo e reconhecimento específico  
em borboletas do Sul do Brasil**

André Luis Klein

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
da UFRGS como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

PORTO ALEGRE  
DEZEMBRO DE 2015

## **INSTITUIÇÕES E AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Parte dos dados também foi obtida no Laboratório de Laser e Ótica do Instituto de Física da UFRGS.

Aos professores, educadores e comunicadores que se empenham na bela tarefa de tornar o conhecimento científico **compreensível e acessível a todos**.

## **AGRADECIMENTOS**

A ciência é uma prática coletiva, e esta pesquisa, portanto, seria impossível sem a colaboração de diversas pessoas. O professor Aldo foi meu orientador desde o final de 2004, no início da minha graduação, até o final deste doutorado, 11 anos depois. Na trajetória, além de exemplo de professor e pesquisador, passou também a ser um grande amigo. Sou eternamente grato por tudo que aprendi com ele em sala de aula, laboratório, saídas a campo e, obviamente, rodas diárias de chimarrão; onde as conversas eram ilimitadas e percorriam as ciências, a academia, a docência, a filosofia, os filmes, a política, as pessoas e as nossas vidas. Considero esta atmosfera temática extremamente livre e informal uma fonte de novas ideias e pontos de vista. Muito obrigado, e espero que possamos “matear” sempre que a oportunidade surgir!

Gostaria de agradecer também ao Marcelo Costa, que, no sentido inverso ao do Aldo, passou de amigo para amigo e colega de trabalho. Sou grato especialmente por ter depositado a confiança em mim como co-orientador e pelos divertidos trabalhos de campo em São Francisco de Paula. Do mesmo modo, agradeço à Etiele Senna pela confiança depositada em mim como coorientador. Seu empenho e suas questões como pesquisadora foram sempre motivantes. A Janaína de Nardin, como colega mais antiga de laboratório, sempre extremamente competente, organizada e responsável, fez dele um espaço mais agradável, além de ser também uma amiga. Outra amiga antiga e colega de trabalho que quero muito agradecer é a Ana Aymoné. Sem estas duas, haveria menos risadas no lab.

Várias pessoas que passaram pelo Laboratório de Genética Ecológica deram parte do seu tempo para ajudar nas criações. Obrigado Ana Oro, Luciana Oro, Bruna Missagia, Pietro Pollo, Rosana Huff e outros que devo estar esquecendo neste momento. Da mesma forma,

foi essencial a colaboração do Marcelo Pereira com as dezenas de baterias de espectrofotometria em seu laboratório, bem como o aceite do Flavio Horovitz nesta parceria. Agradeço também ao bolsista Gustavo, do IF, com algumas medidas. A Aline Quadros foi extremamente solícita em me ajudar a dar os primeiros passos no *R*, fundamentais para esta tese. Muito obrigado a todos! Em campo, ainda, contei com a simpatia do Arnaldo Raiser, que me recebeu prontamente, sem aviso prévio, para capturar borboletas em sua propriedade em Campo Alegre e me surpreendeu com diversas informações sobre estes bichos e as plantas que utilizam no local.

Um doutorado não pode ser resumido a uma pesquisa científica. Durante estes quatro anos amadureci também como professor. Agradeço, além do Aldo novamente, à Eliane Kaltchuck e à Maríndia Deprá pela parceria em disciplinas ministradas com muito gosto. Também amadureceu meu olhar sobre a prática científica e seus aspectos sociais e filosóficos. Neste quesito, preciso agradecer aos amigos do “Grupo Balduino Rambo”, pelas intermináveis discussões na “Sala Fritz Muller” do Departamento de Genética, especialmente ao colega de sala e filósofo da ciência, Leonardo Luvison.

Por fim, aqueles que em alguns sentidos (talvez indescritíveis) são os mais importantes. Meus pais, Ivo e Soeli, sempre me deram liberdade e incentivo para caminhar com as próprias pernas, mesmo que por caminhos muito estranhos ao habitual para eles. Obrigado pela confiança e pela compreensão. Ainda na família, há uma pessoa sem a qual os últimos meses teriam sido um verdadeiro inferno, mas que ao invés disso se tornaram uma fase de transição extremamente alegre, e de certa forma poética, ou mística, para tentar dizer o mínimo. Obrigado, Andi, pelo amor, carinho, amizade e, mais do que tudo nestes últimos dias, o apoio e a paciência. Quase me transformei em um robô, mas você estava sempre ali, me lembrando das coisas realmente importantes da vida: as mais simples.

*"O entendimento da natureza através do pensamento é algo como tentar reproduzir o contorno de uma caverna com o auxílio de uma lanterna com um fecho de luz muito fino. O fecho de luz e a série de pontos por ele iluminados devem ser guardados de memória e é com base nesse registro que o aspecto geral da caverna tem de ser reproduzido. Na prática, portanto, o cientista deve forçosamente usar sua intuição para apreender o conjunto da natureza, mesmo sem acreditar nela. Deve sempre deter-se para comparar a visão intuitiva com o fino e brilhante fecho do pensamento analítico." (Alan Watts)*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO GERAL	
Cores em borboletas: produção, percepção e função .....	10
Heliconíneos: sistemática e alguns traços de importância ecológica .....	15
Mimetismo e especiação em <i>Heliconius</i> .....	18
Coloração e comunicação visual em <i>Heliconius</i> .....	21
As <i>Heliconius</i> no Sul do Brasil e alguns co-mímicos .....	24
Os problemas e abordagens escolhidos para este estudo .....	30
Objetivos .....	38
ARTIGO 1: <i>Quem vê o quê: uma abordagem físico-sensorial sobre o mimetismo em borboletas do Sul do Brasil</i> .....	39
ARTIGO 2: <i>Eficácia da coloração como sinal mediador do reconhecimento específico em três pares de borboletas miméticas do Sul do Brasil</i> .....	82
ARTIGO 3: <i>Etologia comparada da corte em três borboletas Heliconius: possíveis relações com mimetismo e comportamento de voo</i> .....	106

DISCUSSÃO GERAL

Síntese dos resultados .....	127
<i>Trade-offs</i> na evolução de sinais: os casos de <i>Heliconius</i> .....	129
Considerações finais e perspectivas .....	134
REFERÊNCIAS .....	146
ANEXO 1: <i>Dimorfismo sexual e reconhecimento de parceiros em Heliconius ethilla narcaea</i> ( <i>Lepidoptera, Nymphalidae</i> ) .....	147
ANEXO 2: <i>Capacidade visual no reconhecimento de parceiros a partir do dimorfismo</i> <i>sexual de coloração em Heliconius ethilla narcaea</i> .....	174



## RESUMO

O estudo de adaptações deve levar em conta que a forma das características dos organismos afeta os desempenhos de mais de uma função, sendo, portanto, modificada por mais de uma pressão seletiva. Estas diferentes demandas podem ser conflitantes, como no caso da seleção convergente para mimetismo contra a seleção divergente para o isolamento reprodutivo. As borboletas *Heliconius* utilizam o padrão de coloração de advertência das asas também para o reconhecimento de parceiros, o que acaba por gerar um conflito de sinais em potencial quando duas ou mais espécies simpátricas compartilham seu padrão. Neste trabalho, as cores das asas de três espécies de *Heliconius* e de alguns co-mímicos do Sul do Brasil são investigadas através de duas abordagens: uma físico-sensorial, a fim de se caracterizar as diferenças entre cores co-miméticas em termos de discriminabilidade por diferentes tipos de visão, incluindo borboletas e aves; e uma etológica experimental, avaliando a eficácia da coloração das asas como sinal de reconhecimento específico. Uma terceira abordagem procurou caracterizar e comparar a corte das três espécies de *Heliconius* a fim de se explorar mecanismos adicionais de reconhecimento específico e possíveis relações com a convergência mimética. As análises físico-sensoriais deram suporte à hipótese recente de diferenças crípticas nas cores como um possível sinal privado de comunicação para as *Heliconius*, mas os testes comportamentais contrariaram esta expectativa, revelando um alto grau de interferência reprodutiva entre co-mímicos, além de um grau moderado entre não mímicos. A análise comparada da corte sugeriu uma influência maior do mimetismo do que da filogenia sobre a semelhança entre padrões comportamentais. Propomos que esta relação se dê indiretamente através da convergência morfológica na forma das asas e no comportamento de voo entre co-mímicos.

## ABSTRACT

The study of adaptation should take into account that the form of characteristics in organisms affects the performance of more than one function, and therefore are modified by more than one selective pressure. These various demands can be conflicting, as in the case of convergent selection for mimicry against divergent selection for reproductive isolation. The *Heliconius* butterflies use the advertising wing color pattern also for mate recognition, which ultimately generates a potential signal conflict when two or more sympatric species share its pattern. In this work, the wing colors of three species of *Heliconius* and some co-mimics from Southern Brazil are investigated through two approaches: a physical-sensory, in order to characterize the differences between co-mimetic colors in terms of discriminability by different types of view, including butterflies and birds; and an experimental ethological, evaluating the effectiveness of wing coloration as a specific recognition signal. A third approach aimed to characterize the courtship of the three species of *Heliconius* in order to explore additional mechanisms of specific recognition and possible relations with mimetic convergence. The physical-sensory analyzes supported the recent hypothesis of cryptic differences in color as a possible private communication signal for *Heliconius*, but behavioral tests contradicted this expectation, revealing a high degree of reproductive interference between co-mimics, and in addition a moderate degree between non-mimics. The comparative analysis of the courtship suggested a greater influence of mimicry than phylogeny on the similarities between behavioral patterns. We propose that this relationship happens indirectly through morphological convergence in the wings shape and flight behavior between co-mimics.

## INTRODUÇÃO

### **Cores em borboletas: produção, percepção e função**

#### *Produção das cores em borboletas*

O padrão de cores na asa de uma borboleta é na verdade um mosaico de escamas monocromáticas. A cor de cada escama pode ser química, quando se deve à presença de pigmentos, ou estrutural, quando é determinada pela sua forma e pelo arranjo espacial de seu conjunto. Os principais pigmentos das asas de borboletas pertencem a quatro categorias químicas: melaninas, omocromos (e seus precursores), pterinas e flavonóides. Omocromos são pigmentos que variam do vermelho ao marrom e são derivados do triptofano pela rota da quinurenina (Nijhout 1991). No gênero *Heliconius*, o vermelho e alguns tons de laranja amarronzado são o estado oxidado e o reduzido, respectivamente, da xantomatina, um omocromo; e o amarelo é a 3-OH-quinurenina, um dos intermediários da rota da quinurenina (Gilbert et al. 1988).

#### *Visão de cores em borboletas e outros animais*

A visão ocorre pela detecção de luz incidente propagada através de um ambiente, refletida de ou transmitida de uma superfície, capturada finalmente por um olho (Lythgoe 1979). A habilidade para se detectar, discriminar e analisar as distribuições de comprimento de onda da luz é referida como “visão em cores” (Lythgoe 1979, Wyszecki & Stiles 1982). Afirmações bem embasadas de que animais não humanos possuem visão em cores remetem ao período da história natural (e.g. Lubbock 1889), mas a primeira demonstração experimental desta habilidade ficou a cargo de von Frisch (1914/1953), em *Apis mellifera*. Mesmo assim, a maioria dos conceitos e princípios da teoria da visão em cores usados hoje é derivada da percepção e da psicofísica em humanos, tendo sido os

modelos que relacionam nossa discriminação de cores com as respostas de receptores e mecanismos neurais subjacentes originados ainda no século XIX (Maxwell 1860, Hering 1878/1964 e Helmholtz 1909/1962).

O entendimento das cores começa da nossa experiência subjetiva. Desta forma, as cores possuem três propriedades: matiz, saturação e brilho. O brilho é um valor em uma escala acromática que vai do preto ao branco, passando por todas as tonalidades de cinza, podendo ser também entendido como a intensidade de um sinal luminoso. A saturação descreve a similaridade de uma cor com uma luz acromática, isto é, com o branco, o preto ou qualquer tom de cinza. O rosa, por exemplo, é um vermelho com baixa saturação, pois se aproxima mais do branco do que um vermelho “puro” (com alta saturação). A saturação, assim, também pode ser entendida como um grau de “pureza espectral”. O matiz, por fim, se refere às demais diferenças em cores que não são devidas ao brilho ou à saturação. É a diferença do matiz que dá a identidade a uma cor e faz com que as reconheçamos como “verde” ou “amarelo”, independentemente de seu brilho ou saturação. Assim, de acordo com estas propriedades, qualquer cor tem uma qualidade acromática (brilho) e duas cromáticas (matiz e saturação). Pode-se concluir, portanto, que um animal possui visão em cores quando ele é capaz de discriminar duas luzes de diferentes composições espectrais (conjunto de comprimentos de onda) independentemente de sua intensidade, isto é, de seu brilho (Kelber et al. 2003).

O processamento visual se inicia com a captura de fótons por um órgão sensível à luz (olho), geralmente via fotopigmentos contidos dentro de células fotorreceptoras. Um requisito fundamental para a visão em cores é que haja pelo menos dois diferentes tipos de fotorreceptores (em relação à sua sensibilidade espectral), pois de acordo com a teoria do “processamento baseado em oponência” a cor é percebida através da comparação neural

entre os estímulos relativos de diferentes tipos de fotorreceptores. Ou seja, uma mesma razão de estímulo entre as três classes de cones em humanos, por exemplo, independentemente da sua intensidade, produz a mesma sensação de matiz e saturação, isto é, resulta na mesma informação de “cor” (Kemp et al. 2015).

Os pigmentos visuais consistem quase que universalmente de proteínas denominadas “opsinas”, cujas propriedades de absorção são altamente conservadas (Dartnall 1953). Isto significa que uma vez conhecendo-se o comprimento de onda máximo absorvido por um pigmento ( $\lambda_{\max}$ ) pode-se calcular sua curva de absorbância teórica no espectro, seguindo padrões pré-estabelecidos experimentalmente (e.g. Govardovskii et al. 2000; Stavenga 2010). A luz que atinge estes fotorreceptores pode ainda ter sido modificada por reflexão ou filtragem devido a estruturas diversas. Uma destas estruturas são as “gotas de óleo” (*oil droplets*) localizados dentro das células fotorreceptoras de alguns vertebrados (Liebman & Granda 1975). Filtros intracelulares como as gotas de óleo parecem ter evoluído em muitos grupos como um meio de afinação da sensibilidade espectral e/ou melhoramento da discriminação de cores (Cronin & Caldwell 2002; Vorobyev 2003; Hunt et al. 2009; Saarinen et al. 2012).

O padrão geral de organização da visão de cores em borboletas é similar ao de abelhas e zangões. Nestes grupos, o sistema de visão de cores é baseado em três tipos de fotorreceptores, com sensibilidades máximas nas faixas do ultravioleta, do azul e do verde (Stavenga & Arikawa 2006). Se olharmos para a variabilidade de fotorreceptores dentro de cada grupo, no entanto, as borboletas se destacam em relação a himenópteros, aves e primatas – grupos que apresentam pouca variabilidade de fotorreceptores. As borboletas são definitivamente diferentes: houve uma notável irradiação de sensibilidades espectrais em seus fotorreceptores (Osorio & Vorobyev 2008). As borboletas evoluíram a partir das

mariposas, que possuem três fotorreceptores, cada um contendo um pigmento visual específico. Alguns grupos preservaram este arranjo ancestral, mas muitas borboletas possuem mais do que três, em particular no gênero *Heliconius*, conforme será melhor discutido mais adiante.

#### *Funções das cores em 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 impalatabilidade (ou outro mecanismo de defesa). Associado ao aposematismo existe o mimetismo, onde espécies palatáveis adquirem o mesmo fenótipo de modelos impalatáveis (mimetismo Batesiano – Bates 1862); ou diferentes espécies impalatáveis convergem para um mesmo fenótipo (mimetismo Mülleriano – Muller 1879). Apesar de frequentemente confundidos, os dois tipos de mimetismo são, em alguns sentidos, exatamente o oposto um do outro. O mecanismo evolutivo comum a ambos é a divisão dos custos de mortalidade resultantes do processo de aprendizado dos predadores. Esta seleção dependente de frequência, contudo, é inversa entre os dois casos. No mimetismo Batesiano o aprendizado é prejudicado com o aumento da densidade de indivíduos da espécie mímica, palatável, que pode assim ser considerada uma parasita do sinal de advertência da espécie modelo, impalatável. No mimetismo Mülleriano, por outro lado, o aprendizado dos predadores é melhorado com o aumento da densidade de qualquer

uma das espécies, pois ambas contribuem para reforçar a associação entre coloração e impalatabilidade, podendo assim ser consideradas mutualistas (Ruxton et al. 2004).

De um modo geral, podemos dizer que a seleção natural para defesa anti-predatória 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 ecológicos (Vane-Wright e Boppré 1993).

Denomina-se *trade-off* a situação em que um traço não pode melhorar sem que outro seja prejudicado. Outra forma de *trade-off* biológico ocorre quando uma mesma característica que melhora a performance em um aspecto da vida do organismo piora a performance em outra função (Garland 2014). No caso do mimetismo *versus* sinalização sexual, a semelhança na coloração se enquadra perfeitamente como a característica-chave da segunda definição. Em um sentido mais amplo, *trade-off* é qualquer situação que envolve uma troca entre perda de qualidade em algum sentido por um ganho de qualidade em outro. *Trade-offs* biológicos, assim, são um tipo de restrição evolutiva.

### **Heliconíneos: sistemática e alguns traços de importância ecológica**

Dentro ordem Lepidoptera, o grupo artificial que comporta as borboletas separadamente das mariposas é denominado Rhopalocera, e é constituído pela pequena família Hedyliidae juntamente com as superfamílias Hesperioidea e Papilionoidea. Esta última, as “borboletas verdadeiras”, consiste em um grupo monofilético com cinco famílias e aproximadamente 14.500 espécies, sendo mais de 1/3 delas (cerca de 6.000 espécies) pertencentes à família Nymphalidae (Grimaldi & Engel 2005). A diversidade de Nymphalidae, por sua vez, pode ser organizada em várias subfamílias, que por sua vez se dividem em tribos. A tribo neotropical Heliconiini (subfamília Heliconiinae), conhecida popularmente pela expressão “borboletas do maracujá” ou das “videiras-da-paixão” (“*passion-vine butterflies*”) é composta por nove gêneros e tem sido há mais de um século fonte de numerosos exemplos e evidências para a ecologia e a biologia evolutiva como um todo, com destaque em alguns temas como seleção natural, coevolução, irradiação adaptativa, mimetismo e estrutura de comunidades (Beltran et al. 2013).

Quase a totalidade das espécies de Heliconiini utiliza plantas da família Passifloraceae como hospedeiras, relação esta tão estreita que deu o nome popular ao grupo. Esta associação íntima entre heliconíneos e passifloráceas também serviu de base para muito do que se conhece hoje sobre a coevolução inseto-planta (Benson et al. 1976).

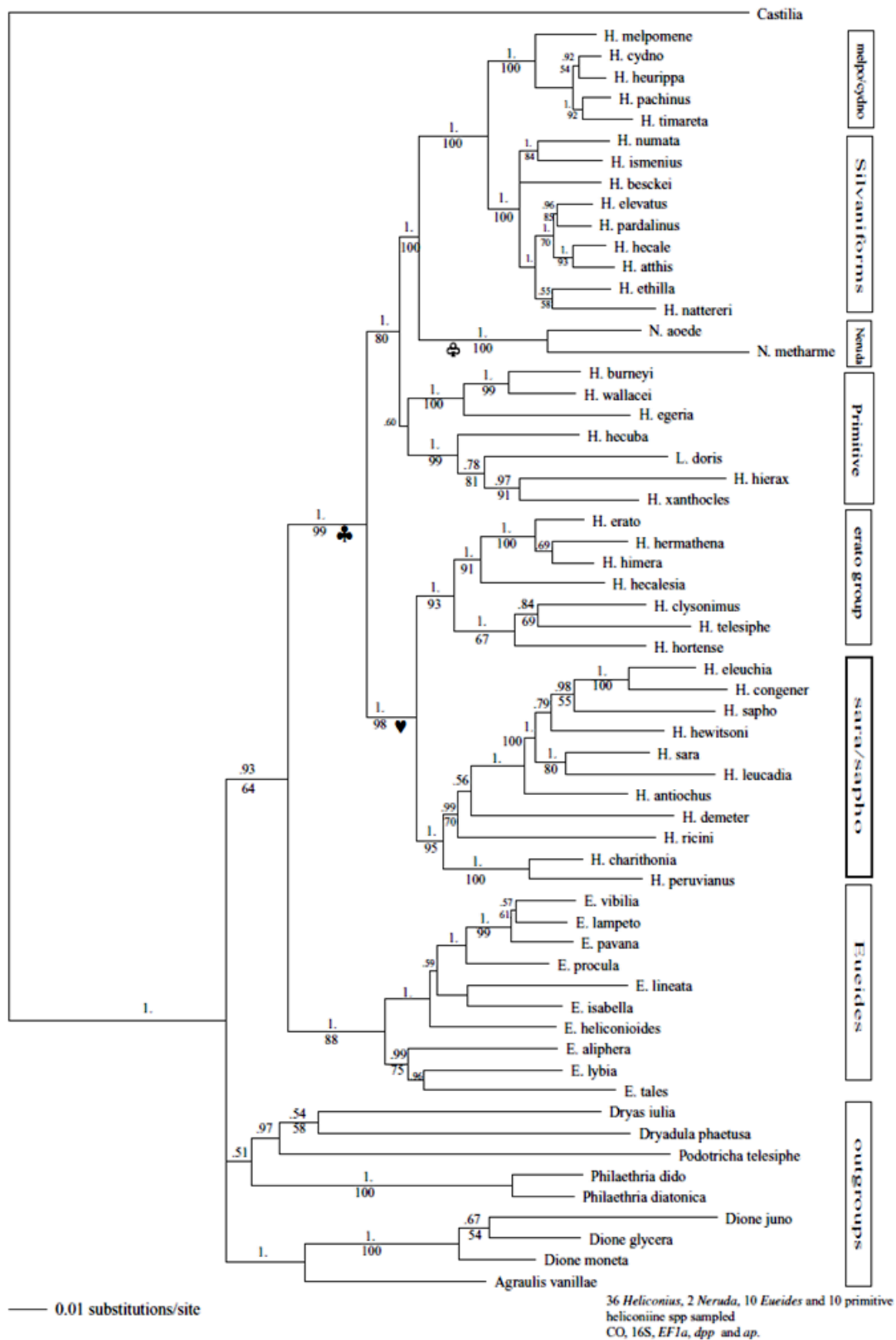
Seis dos nove gêneros da tribo Heliconiini são considerados “basais” do ponto de vista filogenético, sendo os outros três – *Eueides*, *Neruda* e *Heliconius*, mais derivados e responsáveis pela maior parte da diversidade no grupo (Brown 1981).



### *O gênero Heliconius*

As borboletas *Heliconius* possuem duas características ecológicas derivadas únicas. Compartilhado por todo o gênero (Fig. 1), o *uso de pólen* na alimentação (e não apenas néctar, como nas demais borboletas) provê um grande acréscimo nutricional ao adulto e provavelmente é o principal responsável pela altíssima produção de ovos por indivíduo e expectativa de vida bem acima da média em borboletas: até seis meses em campo (Boggs 1981; Gilbert 1972) e até quase nove meses em cativeiro (observação pessoal).

O outro traço de importância ecológica com origem única dentro do gênero é o *cruzamento pupal*, compartilhado por quase metade (42%) das espécies. Nesta forma de acasalamento, os machos procuram ativamente por pupas de fêmeas em meio à vegetação, visitando-as com frequência e permanecendo pousados sobre elas à medida que o dia da eclosão se aproxima. A cópula ocorre antes da fêmea concluir seu processo de eclosão, ainda com as asas não distendidas completamente (Gilbert 1976, Deinert et al. 1994 e Deinert 2003). Mesmo nestas espécies, contudo, os machos podem encontrar fêmeas em vôo e dar início a um processo de cortejo, o qual pode terminar com o aceite ou a rejeição por parte da fêmea (Klein & Araújo 2010). Como as pupas de *Heliconius* são altamente crípticas visualmente, é provável que a comunicação química tenha evoluído de modo mais elaborado nas espécies que realizam esta estratégia de acasalamento (Deinert 2003, Estrada et al. 2010).



**Figura 1.** Filogenia do gênero *Heliconius*, com a indicação de alguns traços de importância ecológica e taxonômica. ♣: uso de pólen; ♥: cruzamento pupal. Extraído de Beltrán et al. (2007).

## **Mimetismo e especiação em *Heliconius***

### *Mimetismo e isolamento reprodutivo*

As borboletas *Heliconius* (Nymphalidae, Heliconiinae) formam um grupo diverso, composto por 42 espécies, algumas das quais possuem ainda uma enorme diversidade fenotípica representada por dezenas de subespécies – formas separadas geograficamente que divergiram no padrão de coloração das asas. Estas borboletas são impalatáveis e cada espécie ou subespécie mimetiza um padrão de outra espécie que ocorra na mesma localidade (Brower et al. 1963; Merrill et al. 2015). Assim, em uma dada região, pode-se encontrar duas ou mais espécies com o mesmo padrão de coloração, enquanto que em regiões diferentes ocorrem formas distintas pertencentes a uma mesma espécie. O foco de diversidade do gênero é a região amazônica, mas sua distribuição geográfica se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos (Emsley 1965; Turner 1976; Brown 1979; Cardoso 2005).

A divergência no padrão de coloração das asas foi um passo crucial da especiação nesse grupo, já que além de servirem como mecanismo de defesa as cores também são usadas no reconhecimento específico. Diversos trabalhos têm demonstrado que os machos têm preferência por fêmeas com o seu próprio padrão de coloração, gerando um grau intermediário de isolamento reprodutivo entre as subespécies (McMillan et al. 1997; Jiggins et al. 2001; Jiggins et al. 2004; Muñoz et al. 2010; Merrill et al. 2011). Assim, uma

vez que o isolamento geográfico tenha levado à divergência fenotípica intraespecífica pela evolução para diferentes anéis miméticos, a seleção sexual pelos machos atua como um reforço do isolamento reprodutivo. Este processo é facilitado por uma forte associação genética entre o loco responsável pela preferência sexual por um padrão de coloração e o loco responsável pela manifestação do padrão em si (Kronforst et al. 2006; Merrill et al. 2011).

As funções de defesa e reconhecimento específico, conforme já discutido acima, podem ser conflitantes em borboletas, já que o mimetismo gera a convergência interespecífica de sinais, enquanto que para o reconhecimento eles devem ser exclusivos de cada espécie (Silberglied 1984; Vane-Wright e Boppré 1993). Estrada e Jiggins (2008) demonstraram a imperfeição do mecanismo de reconhecimento de parceiros entre subespécies de *H. erato* e seus respectivos co-mímicos de *H. melpomene*. Os machos de cada subespécie de um par mimético utilizam os mesmos sinais visuais das asas para a localização e o reconhecimento de fêmeas e gastam um tempo considerável abordando e cortejando seus co-mímicos. O cortejo equivocado entre espécies devido a alguma similaridade fenotípica é denominado "interferência reprodutiva" (Walker 1974) e trata-se de um fenômeno comum em animais (Gröning e Hochkirch 2008). Neste caso de *Heliconius*, contudo, ele pode também ser considerado um custo, ou restrição, para a evolução do mimetismo; ou seja, um *trade-off*.

#### *Mimetismo e hibridação*

Ocasionalmente, indivíduos que diferem geneticamente e taxonomicamente se inter cruzam - fenômeno denominado "hibridação" (Mayr 1963). Pelo menos 13 das 40 espécies de *Heliconius* hibridizam na natureza, sendo os pares mais representativos *H. erato* com *H. himera* - espécies parapátricas cujos híbridos constituem 9,8 % da população em uma

estreita zona de contato - e *H. melpomene* com *H. cydno* - espécies simpátricas com uma fração de híbridos na ordem de 0,05% da população inteira (Mallet et al. 2007, onde também consta uma compilação de todos os dados referentes a registros de híbridos interespecíficos em *Heliconius* e *Eueides*, o gênero mais próximo).

*Heliconius melpomene* e *H. cydno* são simpátricas ao longo da maior parte da América Central e próximo aos Andes, sendo os híbridos regularmente encontrados nas matas da Colômbia, Venezuela e Equador. Cruzamentos em cativeiro revelaram que fêmeas híbridas, embora viáveis, são estéreis, um efeito da "Regra de Haldane" (Naisbit et al. 2002). Por outro lado, os machos híbridos são férteis e podem, portanto, transferir genes do padrão de coloração de uma espécie para a outra. A esterilidade das fêmeas, portanto, embora não com o mesmo nível de importância, deve atuar em conjunto com a seleção sexual e com a seleção ecológica contra padrões não defensivos como mecanismo de isolamento, permitindo a coexistência e integridade genética de *H. melpomene* e *H. cydno* (Mallet et al. 1998).

*Heliconius heurippa*, contudo, uma espécie simpátrica com *H. melpomene melpomene* e parapátrica com *H. cydno cordula* no leste da Colômbia, parece ter sido originada justamente através da hibridação entre estas duas. Os indivíduos gerados pelo intercruzamento das duas últimas em cativeiro apresentaram o mesmo fenótipo que *H. heurippa*. Estes híbridos puderam ainda ser cruzados com *H. heurippa* da natureza e apresentaram forte preferência sexual por fêmeas com seu próprio padrão de coloração. A alta frequência de híbridos (8%) na zona de contato, o isolamento geográfico entre as espécies parentais e o isolamento etológico por seleção sexual, provavelmente em conjunto com outros fatores, propiciaram, portanto, a especiação de *H. heurippa* (Mavárez et al. 2006; Mello et al. 2009).

Além da hibridação *stricto sensu*, isto é, entre espécies distintas, há uma série de estudos em zonas híbridas entre subespécies de *Heliconius* apresentando evidências de especiação incipiente e cruzamentos preferenciais intraespecíficos (Arias et al. 2008; Blum 2007; Muñoz et al. 2010), assim como de seleção sítio-específica em regiões do genoma relacionadas aos padrões de coloração (Baxter et al. 2010; Counterman et al. 2010).

### *Mimetismo e introgressão*

A incorporação de genes de uma espécie no genoma de outra - introgressão - é outra consequência da hibridação. Diferentemente dos casos acima, onde a seleção contra ou a favor dos híbridos desempenha um papel na especiação, a introgressão em *Heliconius* está muito mais relacionada com a adaptação. Análises de sequências de DNA revelaram intercâmbio genético entre *H. melpomene*, *H. timareta* e *H. elevatus*, especialmente em duas regiões genômicas que controlam o padrão mimético de coloração (The *Heliconius* Genome Consortium 2012) e entre *H. hecale*, *H. melpomene*, *H. cydno* e *H. pacheus*; sendo que a primeira pertence a um clado que divergiu há aproximadamente 2,5 milhões de anos daquele em que se encontram as outras três (Kronforst et al. 2006; Kronforst 2008). O fato de o genoma ser capaz de permanecer aberto ao fluxo gênico por tanto tempo após a especiação expande as possibilidades evolutivas que podem ser geradas pela introgressão.

### **Coloração e comunicação visual em *Heliconius***

#### *A produção das cores em Heliconius*

Uma descrição detalhada tanto da ontogênese da pigmentação quanto da ultraestrutura das escamas em *Heliconius erato phyllis* pode ser encontrada em Aymone et al. (2014). Neste

estudo, o aparecimento temporal das cores se dá na ordem vermelho, preto, prateado/marrom (da região de sobreposição entre as asas, onde se localizam as androcônias em machos) e por último o amarelo. Apesar da natureza essencialmente química da coloração em *Heliconius*, há uma correlação entre ultraestrutura da escama e o tipo de pigmento que será nela depositado (Gilbert et al. 1988, Aymone et al. 2014).

A utilização de omocromos nas escamas das asas foi uma inovação evolutiva da família Nymphalidae, uma vez que sua função ancestral era a formação de pigmentos nos olhos (Reed & Nagy 2005). Por essa razão, o modelo para a síntese dos omocromos nas asas de borboletas é baseado no que se conhece para os olhos de *Drosophila*.

Quatro genes cujos produtos participam da rota da quinurenina já foram clonados e tiveram seu padrão de expressão analisado em *Heliconius* (Reed et al. 2008, Ferguson & Jiggins 2009). *vermillion* codifica a triptofano oxidase, que converte o triptofano em formilquinurenina; enquanto que *cinnabar* codifica a quinurenina 3-hidroxilase, que converte a quinurenina em 3-OH-hidroxiquinurenina. A pigmentação vermelha nas asas anteriores de *H. erato cyrbia* ocorre no momento e no local da transcrição sobreposta destes dois genes. Em *H. himera*, apenas *cinnabar* é expresso na região de uma mancha amarelada, sendo esta cor adquirida pelo recrutamento de 3-OH-hidroxiquinurenina diretamente da hemolinfa (Reed et al. 2008). Ferguson e Jiggins (2009) analisaram a expressão de todos os genes da rota do omocromo conhecidos para *Drosophila* ao longo do desenvolvimento pupal do par mimético *H. erato cyrbia* – *H. melpomene cythera*. De forma complementar ao já encontrado, os dados demonstraram que a localização espaço-temporal do pigmento vermelho (dihidro-xantomatina) em *H. erato* é indicada por *cinnabar* e *vermillion*, enquanto que em *H. melpomene* esta localização pode ser determinada pelo *cinnabar* sozinho. Assim, tanto padrões de expressão compartilhados quanto divergentes estão

associados aos fenótipos miméticos de *Heliconius*. O mesmo estudo identificou outros genes (*scarlet* e *kf*) cujo padrão de expressão se correlaciona com a pigmentação das asas. Estes genes, portanto, são os mais prováveis alvos de controle dos locos segregados em experimentos de mapeamento genômico por cruzamento entre subespécies.

#### *Comunicação visual intra e interespecífica em Heliconius*

Em *Heliconius erato petiverana* (que possui uma mancha vermelha nas asas anteriores e uma barra de cor creme nas posteriores) foi demonstrada a importância do vermelho para diminuir o número de ataques por predadores (Benson 1972), sendo esta uma das poucas demonstrações experimentais de seleção natural para mimetismo Mülleriano. 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, embora apenas com base em observações casuais, que *H. besckei* (Figuras 2A e 2B) utilizaria a barra amarela/creme das asas posteriores como sinal de reconhecimento específico (Emsley 1970). Recentemente um estudo de Finkbeiner et al. (2014), com uma série de elegantes tratamentos experimentais, demonstrou ter as cores muito mais peso do que o padrão (arranjo espacial das cores) para evitar a predação e para a atração de machos pelas fêmeas, embora no contexto sexual o padrão também tenha se revelado importante, mas em menor grau. Os resultados no contexto da predação corroboraram os de Aronsson & Gamberale-Stille (2008) de que aves predadoras atentam mais às cores do que ao padrão no processo de aprendizado aposemático com sinais visuais.

Já foi mencionado acima que borboletas apresentam uma maior variabilidade em termos de sensibilidade espectral do que qualquer outro grupo já estudado. Nos olhos de *Heliconius*, foram identificados quatro tipos de opsinas com picos de sensibilidade ao redor de 355 nm



(UV1), 398 nm (UV2), 470 nm (azul) e 555 nm (ondas longas) (Zaccardi et al. 2006; Briscoe et al. 2010; Yuan et al. 2010). Este sistema visual particular do gênero provavelmente coevoluiu com a pigmentação das asas, onde o amarelo provém da 3-hidroxi-quinurenina (3-OHK) e reflete luz também na faixa do ultravioleta. A duplicação das opsinas UV em *Heliconius*, assim, seriam uma adaptação para a discriminação entre parceiros coespecíficos e co-mímicos heteroespecíficos, que utilizam pigmentos para o amarelo que não refletem na faixa do UV e carecem da segunda opsina sensível ao UV nos olhos (Briscoe et al. 2010; Bybee et al. 2012). Em uma comparação dos três principais componentes da coloração entre sete pares miméticos formados cada um por uma forma de *Heliconius numata* (polimórfica) e uma espécie de *Melinaea*, a diferença mais marcante, de fato, se deu no amarelo, cuja discriminação foi maior quando confrontada com modelos visuais das borboletas do que de aves (Llaurens et al. 2014), corroborando as hipóteses derivadas dos estudos com opsinas.

### **As *Heliconius* no Sul do Brasil e alguns co-mímicos**

#### *Heliconius no Sul do Brasil*

Quase a totalidade dos esforços de pesquisa sobre mimetismo, isolamento reprodutivo e especiação no gênero *Heliconius* esteve até agora centrada entre o Norte do Brasil e a América Central, compreendendo, portanto, espécies, subespécies e populações essencialmente amazônicas. Contudo, outras regiões, incluindo especialmente a Mata Atlântica, abrigam algumas espécies e subespécies endêmicas para as quais se tem muito pouco conhecimento até mesmo de sua biologia básica. *H. besckei* Ménétriés 1857 (Figuras 2A e 2B) possui distribuição muito restrita e não se divide em raças geográficas.

Típica de locais com altitude superior a 700 metros, ocorre no Sul e Sudeste, com apenas um registro (Cardoso 2005) para o Nordeste do Brasil. Em um ramo muito próximo da filogenia está *H. ethilla* Godart 1819, cuja subespécie *narcaea* (Figuras 3A e 3B) ocorre no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país . Em um clado afastado, que inclui somente as espécies que executam "cruzamento pupal", está *H. erato*, cuja subespécie *phyllis* Fabricius 1775 (Figuras 2C e 2D) é mímica de *H. besckei* e pode ser encontrada em abundância desde o Sul até o Nordeste e do Centro-Oeste até a costa litorânea (dados de distribuição em Brown 1979).

Apesar de sua distribuição ser relativamente ampla, não há muitas áreas onde estas espécies ocorram em simpatria; fato limitado principalmente pela escassez de *H. besckei*. Mesmo assim, existem espécimes em coleções aos quais se atribuiu o status de híbridos entre *H. besckei* e *H. ethilla narcaea*, capturados em Santa Catarina (4 indivíduos), São Paulo e Rio de Janeiro (1 indivíduo em cada) (ver Mallet et al. 2007 e banco de dados em <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-7-28-s1/index.html>). No entanto, nenhum estudo contemplando o comportamento sexual e o isolamento reprodutivo nestas duas espécies foi feito até o momento.

No par formado por *H. besckei* e *H. erato phyllis* a hibridação deve ser bem menos provável, já que estas divergiram há muito mais tempo. Contudo, outra falha do isolamento reprodutivo pode ocorrer entre elas – a interferência reprodutiva, já que estas convergiram para o mesmo padrão de coloração das asas. Emsley (1970), em uma pequena nota, relata que *H. besckei* parece ser atraída por *H. erato phyllis*, com a qual inicia perseguições em voo, mas não por *H. melpomene melpomene* que, 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 é o caso de *H. erato hydara*, segundo Crane (1955).

#### *Co-mímicos de Heliconius no Sul do Brasil*

Ainda dentro da família Nymphalidae, porém não mais na subfamília Hliconiinae, existem pelo menos mais três espécies que compartilham o padrão de coloração das asas e vivem em simpatria com alguma das *Heliconius* ocorrentes no Sul do Brasil. *Eresia lansdorfi* Godart 1819 (Nymphalinae, Melitaeini) (Figuras 2E e 2F) também apresenta o “padrão besckei” (termo que de agora em diante será utilizado para se referir à coloração compartilhada por *H. erato phyllis*, *H. besckei*, e *E. lansdorfi*), embora em tonalidades diferentes mesmo à visão humana, principalmente na face ventral das asas. Além das diferenças em tonalidade, *E. lansdorfi* é menor do que seus modelos de *Heliconius* (cerca de 5cm de envergadura, contra aproximadamente 7 cm de *H. erato* e *H. besckei*), possui claras diferenças na forma das asas (apesar de apresentar o aspecto “alongado” típico de *Heliconius*) e no tipo de voo (observações pessoais). *E. lansdorfi* é encontrada em alguns dos mesmos locais onde ocorrem um ou ambos de seus modelos de *Heliconius* no Sul do Brasil, embora em abundância muito mais baixa, e costuma ovipositar sobre plantas da família Acanthaceae (Biezanko et al. 1974). Embora haja evidências de que outros membros de Melitaeini adquiram proteção química através do sequestro de iridóides de plantas na fase larval, as plantas hospedeiras de *Eresia* não apresentam compostos tóxicos (Wahlberg 2001), podendo-se considerar *E. lansdorfi* um mímico Batesiano.

As outras duas espécies de ninfalídeos que mimetizam *Heliconius* do Sul do Brasil compartilham o padrão de coloração com *H. ethilla narcaea* e são ambas classificadas dentro da subfamília Danainae, na tribo Ithomiini. *Mechanitis lysimnia* Fabricius 1807

(Figuras 3C e 3D) e *Placidina euryanassa* C. Felder & R. Felder 1860 são borboletas impalatáveis que utilizam solanáceas como plantas hospedeiras (Biezanko et al. 1974) e sequestram delas alcalóides pirrolizidínicos (Freitas et al. 1996, Schulz et al. 2004). Ambas são menores do que *H. ethilla narcaea*, tendo a primeira pouco mais de 5 cm de envergadura e a segunda não passando de 7 cm, enquanto que *H. ethilla narcaea* varia de 7 cm a 9 cm de envergadura. Outras diferenças mais evidentes são a ausência da mancha branca mais distal nas asas anteriores de *P. euryanassa* e o amarelo menos intenso, mais translúcido, nesta mesma espécie.



**Figura 2.** Espécies do padrão mimético "besckei". A e B, *Heliconius besckei*; C e D, *Heliconius erato phyllis*; E e F, *Eresia lansdorfi*.



**Figura 3.** Espécies do padrão mimético "ethilla". A e B, *Heliconius ethilla narcaea*; C e D, *Mechanitis lysimnia*; E e F, *Placidina euryanassa*.

## Os problemas e abordagens escolhidos para este estudo

### *Cores das asas*

O estudo das cores nos organismos constitui por si só um campo fértil de perguntas e respostas para a ciência. Os contextos em que se inserem cada caso particular e as idiosincrasias deles resultantes, contudo, fornecem uma variedade ainda maior de hipóteses de trabalho, bem como limitações para a sua investigação. O cenário ecológico-evolutivo de *Heliconius* em que se insere a coloração – de indivíduos adultos, mais precisamente – é o da pressão resultante da mortalidade diferencial por predadores visualmente guiados; ou seja, do mimetismo; e ao mesmo tempo é o da pressão resultante do sucesso diferencial em se localizar, reconhecer e persuadir indivíduos coespecíficos do sexo oposto para fins de reprodução (podemos considerar ainda a termorregulação como uma terceira demanda funcional importante relacionada à coloração). A primeira pressão seletiva tende a reduzir diferenças entre co-mímicos que possam ser detectadas por seus predadores, já a segunda tende a aumentar diferenças que facilitem a discriminação entre co-mímicos por uma ou ambas as espécies.

Para as três espécies de *Heliconius* do Sul do Brasil acima apresentadas este cenário de potencial conflito seletivo se configura em locais de simpatria entre dois ou três membros de um mesmo padrão mimético (Figura 4). Outro fator importante neste caso, contudo, pode ser a chance de interferência reprodutiva entre *H. besckei* e *H. ethilla narcaea* devido à sua proximidade filogenética e à chance de hibridação sugerida pela existência de indivíduos com coloração intermediária entre ambas.

Além de todo o conhecimento referente à coloração e à visão dos organismos aqui estudados – as borboletas *Heliconius* – este trabalho também pode usufruir de técnicas



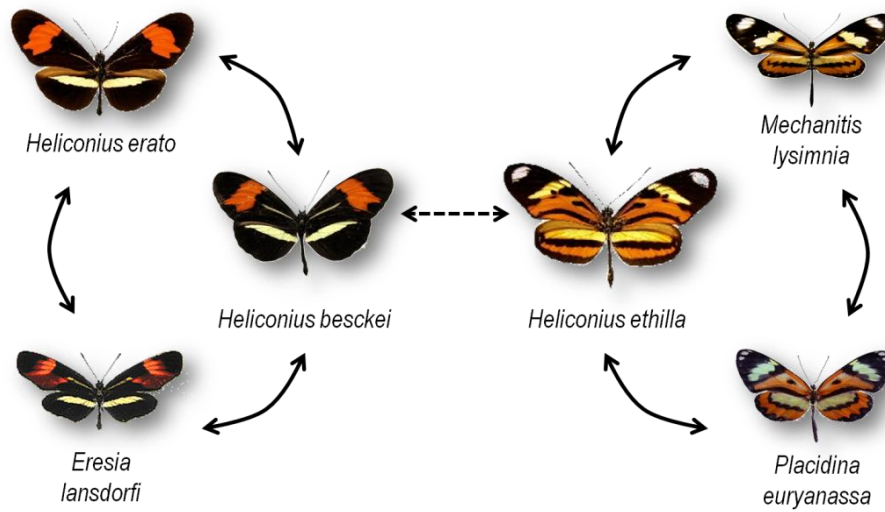
recentes desenvolvidas nos campos da colorimetria e da modelagem visual. Desde os trabalhos mais pioneiros, principalmente de Endler (e.g. 1990) que delineavam novos métodos objetivos para a avaliação de cores levando-se em conta diferentes tipos de visão e a natureza ambiente-dependente dos sinais de comunicação, uma série de novas técnicas, aliadas a um maior conjunto de dados experimentais (de aves, em sua maioria) e teorias desenvolvidas, vem sendo publicada nos últimos anos (e.g. Kelber et al. 2003, Endler et al. 2005, Endler & Mielke 2005, Stoddard & Prum 2008, Renoult et al. 2013, Delhey et al. 2015, Kemp et al. 2015). De acordo com a revisão de Kemp et al. (2015), é possível hoje se dividir as pesquisas sobre cores na natureza em termos de duas escolas de perguntas. A primeira escola, chamada “top-down”, aborda as cores como uma característica com importância ecológica e/ou evolutiva para os organismos portadores, isto é, suas funções últimas em termos de sobrevivência e reprodução. A segunda escola, “bottom-up”, procura entender as bases proximais da propagação, recepção e percepção das cores. Em última análise, pesquisadores “bottom-up” fornecem as bases intelectuais para se desenvolver análises de cores e modelos perceptuais, que são por sua vez ferramentas usadas para se interpretar resultados de estudos “top-down”. Neste quadro, os autores preveem uma oportunidade crescente para se atravessar os limites entre as duas escolas via desenvolvimento de hipóteses-chave, embora às vezes imperfeitas, derivadas diretamente das considerações de estudos físicos a serem testadas em contextos ecológico-evolutivos.

Buscando uma reconciliação dos estudos de base perceptiva/sensorial com os estudos ecológicos e evolutivos de coloração, Kemp et al. (2015) reconhecem três abordagens analíticas discretas na literatura “top-down”: (1) física/espectral, (2) distância perceptual e (3) discriminatória. A abordagem física/espectral trata de questões em que a dependência de sistemas sensoriais pode ser desconsiderada. Assim, os dados de cores são sumarizados

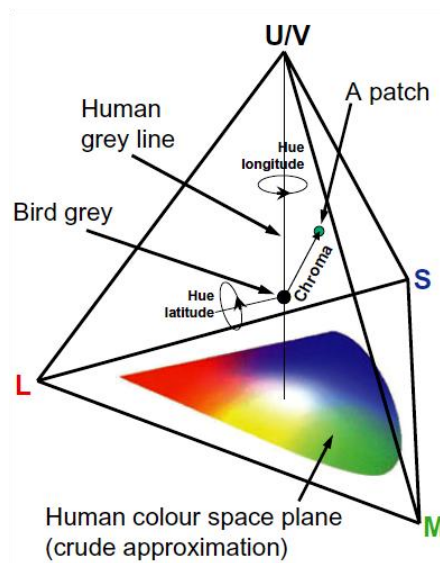


e analisados a partir de suas curvas de reflectância (obtidos através de um espectrofotômetro) ao longo do espectro de comprimentos de onda. Existem diversas técnicas para se fazer isso, incluindo a integração das curvas ao longo de uma secção do espectro, análise de componentes principais (PCA) e análise de segmentos pré-estabelecidos. Justamente devido à sua independência perceptual, as conclusões de cunho ecológico e evolutivo devem ser cautelosas em análises deste tipo. A segunda categoria de questões, por outro lado, está interessada em responder quão distantes dois estímulos de cores se situam um do outro dentro de um espaço perceptual. Evidentemente, este tipo de análise requer o conhecimento das curvas de sensibilidade visual do observador de interesse. Tais curvas podem ser obtidas via densitometria epi-microespectrofotométrica dos olhos (e.g. Briscoe et al. 2010) ou, mais comumente, estimadas a partir dos picos de sensibilidade (absorbância máxima) de cones do observador de interesse, através de modelos fisiológicos quantitativos pré-estabelecidos. Este nível de informação torna possível, por exemplo, plotar a reflectância espectral de objetos dentro de um “espaço de cores baseado na captura de fótons”, um tipo de diagrama de cromaticidade. Tais diagramas representam as cores de acordo com o estímulo relativo de diferentes tipos de fotorreceptores. Tricromatas, como humanos não-daltônicos, possuem três tipos de cones. Desta forma, nosso diagrama de cromaticidade consiste no espaço bidimensional delimitado pelos valores de absorbância máxima de cada um destes cones. Para algumas borboletas e aves que possuem quatro tipos de cones, portanto, este espaço é tridimensional (Figura 5). Como a representação se dá em termos do estímulo relativo dos cones (da mesma forma que a percepção das cores), um ponto situado no centro geométrico destes diagramas corresponde a um estímulo acromático, isto é, preto, branco ou cinza, dependendo da intensidade (brilho) do sinal. Por outro lado, quanto maior a

distância do centro e mais próximo de um dos vértices do espaço, maior a saturação da cor. O matiz, por fim, corresponde ao ângulo (ou dois ângulos, em um espaço tridimensional) que o ponto referente ao estímulo forma com a origem acromática. Assim, uma cor dentro do espaço de cores com  $n$  classes de cones pode ser descrita por meio de um conjunto de coordenadas em número igual a  $n-1$  (duas para tricromatas e três para tetracromatas, por exemplo). Uma propriedade bastante útil de espaços de cores consiste na possibilidade de se calcular a distância euclidiana entre dois pontos ou, no caso de uma amostragem com múltiplos pontos, a área de interseção entre dois conjuntos. Dada a analogia muito próxima do estímulo relativo de cones em um espaço de cores e o modo como se dá o processamento neural visual, estas informações podem ser confiavelmente interpretadas em termos de discriminabilidade (para mais detalhes sobre “espaços de cores”, ou “diagramas de cromaticidade”, ver Endler & Mielke 2005 ou Stoddard & Prum 2008). A terceira categoria de análises, ditas “discriminatórias” de fato, busca responder se dois estímulos podem ser diferenciados por um observador específico. O modelo mais utilizado é o *limitado pelo ruído do receptor* (“receptor-noise-limited model) de Vorobyev & Osorio (1998), onde as diferenças entre dois estímulos de cores são representados em unidades de *diferenças apenas notáveis*, ou JND’s (“just noticeable differences”). Um JND corresponde aproximadamente ao mínimo de diferença requerido para produzir uma variação detectável por um dado receptor. Este valor é estabelecido empiricamente ou é previsto em termos do número de desvios padrão separando dois estímulos. A aplicação efetiva deste modelo, contudo, requer considerações específicas como iluminação do ambiente e intensidade do sinal (Kemp et al. 2015).



**Figura 4.** Possibilidades de interferência reprodutiva entre as espécies de ninfalídeos deste estudo devido ao mimetismo (setas cheias) ou à proximidade filogenética (seta tracejada).



**Figura 5.** “Espaço de cores” para visão tetracromática. Cada vértice representa o estímulo máximo que pode ser captado pelos cones de ondas curtas (S), médias (M), longas (L) e UV. As duas qualidades das cores, matiz (*hue*) e saturação (*chroma*) podem ser estimadas pela sua localização (detalhes no texto). Extraído de Endler & Mielke (2005).

### *Discriminação visual*

O tipo de discriminação visual investigado neste estudo não pode ser diretamente relacionado com as informações provenientes das análises físico-sensoriais, pois enquanto naquelas parte-se da reflectância de cores isoladas, neste as cores são apresentadas no contexto de *padrão*, isto é, arranjadas espacialmente com os demais componentes sobre a superfície das asas. Contudo, optamos por explorar a possibilidade de conflito de sinais entre co-mímicos justamente a partir do padrão de coloração, do mesmo modo que os demais trabalhos com *Heliconius* já realizados; em primeiro lugar, para fins de comparação com aqueles, em segundo lugar, para permitir uma inferência mais confiável no contexto natural do encontro entre indivíduos, e por fim, devido à metodologia baseada na construção de modelos com asas que já havia se mostrado promissora em trabalhos anteriores.

A metodologia aqui utilizada, baseada em modelos “iscas” construídos com asas reais e expostos de forma pareada, heteroespecífico e coespecífico (detalhes no artigo correspondente), possui a vantagem de isolar todo sinal visual que pode ser recebido pelos indivíduos avaliados, isto é, padrão de coloração e forma das asas, desprezando-se componentes químicos e comportamentais. Além da comparação quantitativa da atratividade exercida pelos modelos de um mesmo experimento sobre os machos de uma mesma espécie (o objetivo principal) também foi do interesse desta abordagem comparar a eficácia da discriminação entre diferentes espécies, ou seja, entre diferentes experimentos.

### *Comportamento de corte*

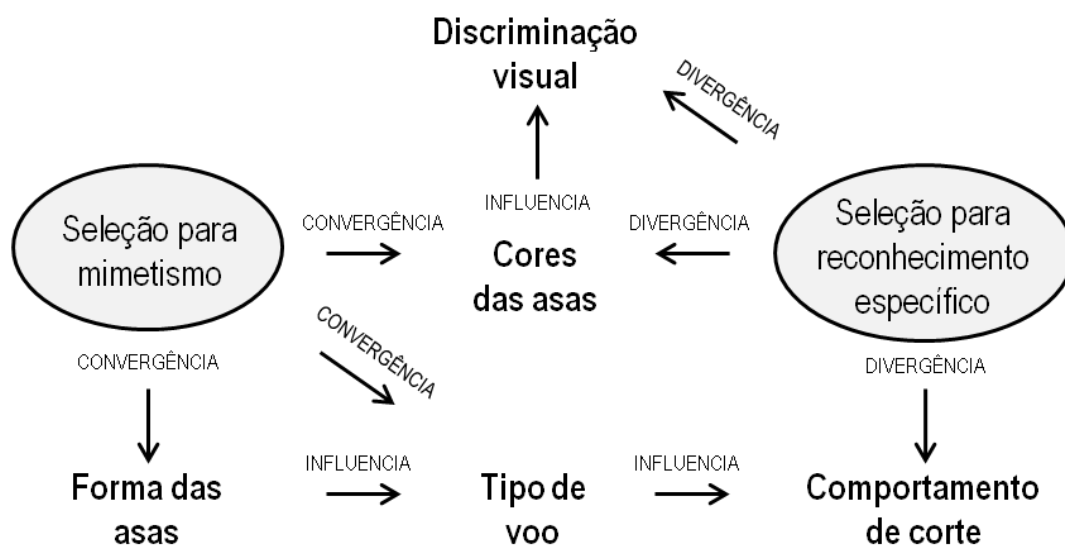
A corte pode ser definida como “a parte da sequência de acasalamento (tipicamente, mas não exclusivamente antes da cópula) em que macho e/ou fêmea estão de frente um para o

outro e respondendo um ao outro, pelo menos um deles sexualmente e positivamente” (Alexander et al. 1997). O cortejo e as estruturas com ele envolvidas são também o principal alvo da seleção para o isolamento reprodutivo comportamental, a mais importante barreira ao cruzamento entre espécies segundo Mayr (1963). Os rituais de corte de borboletas já despertavam a curiosidade de naturalistas, contudo, antes mesmo de se atribuir a eles um papel na especiação; quando no máximo se especulavam relações entre este comportamento e as cores, muitas vezes mais vistosas nos machos (Darwin 1871). Atualmente, há um bom número de evidências para a função da corte em animais tanto na escolha (Andersson 1994) quanto no reconhecimento de parceiros; ou seja, para a seleção sexual e o isolamento reprodutivo.

Diferenças interespecíficas na coloração ou no cortejo têm sido demonstradas como tendo grande importância para o reconhecimento específico em borboletas (Silberglied 1984, Fordyce et al. 2002, Pinzari & Sbordoni 2012); e mesmo estudos de etologia comparada podem revelar diferenças, qualitativas ou quantitativas, muitas vezes sutis, em componentes da corte entre espécies próximas (Tinbergen 1972, Friberg et al. 2008). Tais estudos descritivos comparados, e as diferenças neles detectadas, são muitas vezes a fonte de hipóteses mais precisas para serem testadas experimentalmente, como o significado de determinada postura ou movimento, ou a natureza do sinal sendo emitido em uma fase do cortejo, por exemplo.

Apesar de seu destaque como organismo de estudo em biologia evolutiva, no que diz respeito ao comportamento reprodutivo as pesquisas com *Heliconius* têm sido focadas quase exclusivamente na atração de machos por diferentes fenótipos de fêmeas (Merrill et al. 2015). Até o momento, apenas duas subespécies de *H. erato* tiveram seu comportamento de corte descrito em detalhes (Crane 1955, Klein & Araújo 2010). O

presente estudo, assim, expande as informações relativas ao cortejo, principalmente com finalidade comparativa, para a espécie mimética, porém distante evolutivamente, *H. besckei* e a não mimética, mas próxima evolutivamente de *H. besckei*, *H. ethilla narcaea*. O posicionamento filogenético destas três espécies simpátricas somado ao mimetismo entre apenas duas delas fornece uma pergunta importante passível de contribuição advinda da biologia comparada: a maior divergência no ritual de corte se deu entre as espécies filogeneticamente próximas porém com diferentes padrões de coloração ou entre as fenotipicamente próximas mas distantemente aparentadas? A convergência entre comímicos em outros traços que não a coloração, como forma das asas (Jones et al. 2013), comportamento de voo (Srygley 1999) e nicho ecológico (Elias et al. 2008), sugere a possibilidade de convergência também no comportamento de corte, seja este diretamente selecionado ou ao menos como consequência secundária de convergência morfológica e locomotora.



**Figura 6.** Inter-relações que podem ocasionar *trade-offs* entre os produtos da seleção para mimetismo e da seleção para reconhecimento específico em borboletas através de suas consequências esperadas sobre características físicas e comportamentais.

## Objetivos

### *Objetivo geral*

Este estudo visa identificar consequências custosas (*trade-offs*) da evolução do mimetismo em borboletas do Sul do Brasil decorrentes de duas pressões ecológicas potencialmente conflitantes: a seleção natural convergente para defesa antipredatória e a seleção natural divergente para o reconhecimento específico.

Este trabalho também contribui para ampliar a caracterização da variabilidade fenotípica nas borboletas *Heliconius*. As *Heliconius* podem ser consideradas hoje um grupo de destaque em termos de suas contribuições para a compreensão de processos evolutivos formadores e mantenedores da diversidade biológica (Merrill et al. 2015); contudo, há grandes lacunas de informações para espécies e populações da região Sul do Brasil.

### *Objetivos específicos:*

1. Comparar as cores das asas de três espécies de *Heliconius* e de co-mímicos simpátricos através de colorimetria e da sua percepção em diferentes modelos visuais, verificando as possibilidades de discriminação tanto por coespecíficos quanto por predadores.
2. Medir a eficácia da coloração das asas como sinal mediador do reconhecimento específico para os machos de cada uma das três espécies de *Heliconius* em dois pares miméticos, um intragenérico e outro intergenérico, bem como entre duas espécies não miméticas mas filogeneticamente próximas.
3. Descrever os comportamentos de corte de *Heliconius ethilla narcaea* e *H. besckei* e analisá-los comparativamente entre si e com *H. erato phyllis* (já descrito em trabalho anterior), explorando a possibilidade de convergência para este traço entre co-mímicos.

**ARTIGO 1:**

*Quem vê o quê: uma abordagem físico-sensorial sobre o mimetismo em borboletas do Sul do Brasil.*

*Who sees what: a physical-sensory approach on the mimicry of butterflies from Southern Brazil.*

André Luis Klein, Marcelo Barbalho Pereira, Flavio Horowitz e Aldo Mellender de Araújo.

Artigo em preparação a ser submetido para a revista *Ecology and Evolution*



**Who sees what: a physical-sensory approach on the mimicry of butterflies from Southern Brazil.**

André Luis Klein<sup>1</sup>, Marcelo Barbalho Pereira<sup>2</sup>, Flavio Horowitz<sup>2</sup> e Aldo Mellender de Araújo<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup> 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

Como qualquer estrutura biológica, os sinais de comunicação animal geralmente são utilizados em mais de um contexto ecológico. As cores das asas das borboletas são um exemplo clássico, uma vez que servem como sinal de advertência para predadores e sinal de reconhecimento de parceiros para coespecíficos. No mimetismo, contudo, os sinais de advertência convergem entre espécies, de modo que se espera a existência mecanismos de compensação, como canais privados de comunicação, a fim de se evitar a interferência reprodutiva por confusão de sinais. Recentemente foi sugerido que diferenças crípticas no amarelo das asas evoluíram em paralelo com uma opsina sensível ao UV nas borboletas *Heliconius*, possibilitando a discriminação de co-mímicos de outros gêneros. Neste estudo, aplicamos técnicas modernas de colorimetria visual sobre espécies ainda inexploradas de *Heliconius* e co-mímicos ocorrentes no Sul do Brasil, caracterizando as diferenças entre cores co-miméticas em termos de discriminabilidade pela visão de coespecíficos e predadores em potencial, comparando também o desempenho de sistemas visuais nesta tarefa quanto a tri ou tetracromaticidade na visão de borboletas e à presença ou ausência de filtros intraoculares em aves. Encontramos diferenças significativas entre os amarelos de *H. ethilla* e dois co-mímicos intergenéricos perante a visão tetracromática das *Heliconius*, mas não entre estes dois co-mímicos. Surpreendentemente o amarelo também diferiu no par mimético *H. erato-H. besckei*, expandindo a possibilidade de seu uso também na discriminação intragenérica. Os filtros intraoculares das aves não melhoram significativamente a discriminação entre presas miméticas e a tricromaticidade de borboletas se mostrou mais eficiente para discriminar uma cor apenas no par de borboletas que possuem este tipo de visão.

Palavras-chave: *Heliconius*, Modelagem visual, Diagrama de cromaticidade, Predação.

## INTRODUÇÃO

Um sinal pode ser definido como “qualquer ato ou estrutura que altera o comportamento de outros organismos, que evoluiu devido a este efeito, e que é eficiente porque a resposta do receptor também depende de propriedades evoluídas do cérebro e de órgãos sensoriais” (Maynard Smith & Harper 2003). Neste contexto, qualquer investigação de sinais na comunicação animal é incompleta se não se levar em conta, para começar, a forma ou as formas em que eles são *percebidos* por organismos ecologicamente importantes. Contudo, conforme já notado por Charles Darwin (1859) em *A Origem das Espécies*, “O organismo como um todo é tão internamente atado que quando ocorrem variações sutis em uma parte, e são acumuladas por seleção natural, outras partes se tornam modificadas. Este é um tema muito importante, porém dos mais mal compreendidos”. Uma das formas de se abordar este problema atualmente é através do conceito de *trade-off*. Um *trade-off* biológico existe quando um traço não pode ser aperfeiçoado sem que outro perda em qualidade. *Trade-offs* também ocorrem quando as *performances* de duas funções são afetadas de maneiras opostas por uma mesma modificação evolutiva (Garland 2014). Um ganho de força, por exemplo, pode significar perda de velocidade. De um modo geral, portanto, *trade-off* é qualquer situação que envolva conflito de “escolha”. Um bom candidato para o segundo tipo de *trade-off* é o conflito entre a seleção para mimetismo e a seleção para reconhecimento específico em borboletas. O primeiro processo favorece a convergência fenotípica, geralmente da coloração de advertência, tornando as espécies envolvidas cada vez mais difíceis de serem discriminadas (Bates 1862, Müller 1879). Este resultado, portanto, conflita com o segundo processo, que favorece a divergência fenotípica de sinais, principalmente a coloração, tornando diferentes espécies cada vez mais difíceis de serem confundidas entre si. O conflito em potencial se torna ainda mais grave quando as espécies

miméticas são filogeneticamente próximas, pois estas muitas vezes compartilham também padrões comportamentais e de utilização de recursos (Silberglied 1984, Vane-Wright e Boppré 1993). A evolução do mimetismo, assim, possui o custo do risco de desperdício de tempo e energia gastos com interações sexuais heteroespecíficas, podendo levar ao extremo da hibridação em alguns casos. Também pode ser visto como custo da evolução do mimetismo o desenvolvimento de sistemas de comunicação (sinais e os mecanismos de emissão, percepção e processamento subjacentes) que evoluíram devido à convergência mimética, como forma de “compensação” ou “contorno” da perda de conspicuidade.

A literatura sobre mimetismo em borboletas tem como um de seus principais personagens o diverso grupo com cerca de 42 espécies, algumas das quais podendo ter até uma dezena de subespécies, que constitui o gênero *Heliconius*. Na verdade, as borboletas *Heliconius* se destacam como um dos táxons que mais trouxeram contribuições para a biologia evolutiva como um todo, principalmente no que diz respeito a temas como irradiação adaptativa, convergência evolutiva, coevolução e especiação (uma revisão abrangente pode ser encontrada em Merrill et al. 2015). Estas borboletas são impalatáveis e cada espécie ou subespécie mimetiza um padrão de outra espécie que ocorra na mesma localidade (Brower et al. 1963). Assim, em uma dada região, pode-se encontrar duas ou mais espécies com o mesmo padrão de coloração, enquanto que em regiões diferentes ocorrem formas distintas pertencentes a uma mesma espécie. O foco de diversidade do gênero é a região amazônica, mas sua distribuição geográfica se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos (Emsley 1965, Turner 1976, Brown 1979, Cardoso 2005).

A divergência no padrão de coloração das asas foi um passo crucial da especiação nesse grupo, já que além de servirem como mecanismo de defesa as cores também são usadas no reconhecimento específico. Diversos trabalhos têm demonstrado que os machos têm

preferência por fêmeas com o seu próprio padrão de coloração, gerando um grau intermediário de isolamento reprodutivo entre as subespécies (McMillan et al. 1997, Jiggins et al. 2001, Jiggins et al. 2004, Muñoz et al. 2010, Merrill et al. 2011). Devido a este processo as cores das *Heliconius* podem ser consideradas "traços mágicos" – aqueles que são ao mesmo tempo alvo de seleção natural divergente e mediadores de isolamento reprodutivo, promovendo um processo de especiação mais rápido do que quando as barreiras reprodutivas surgem do acúmulo de diferenças em outras características após a divergência ecológica (Hoskin & Higgie 2010). Como já mencionado acima, contudo, esta mesma dualidade de funções em borboletas pode acarretar custos na forma de *trade-offs*. Estrada e Jiggins (2008) demonstraram a imperfeição do mecanismo de reconhecimento de parceiros entre subespécies de *H. erato* e seus respectivos co-mímicos de *H. melpomene*. Os machos de cada subespécie de um par mimético utilizam os mesmos sinais visuais das asas para a localização e o reconhecimento de fêmeas e gastam um tempo considerável abordando e cortejando seus co-mímicos. O cortejo equivocado entre espécies devido a alguma similaridade fenotípica é denominado "interferência reprodutiva" (Walker 1974) e trata-se de um fenômeno comum em animais (Gröning e Hochkirch 2008). Finkbeiner et al. (2014) demonstrou ter as cores muito mais peso do que o padrão (tamanho, forma e arranjo espacial das manchas) para *H. erato* evitar a predação e para a atração de machos pelas fêmeas; embora no contexto sexual o padrão também tenha se revelado importante, mas em menor grau. Os resultados no contexto da predação corroboraram os de Aronsson & Gamberale-Stille (2008) de que aves predadoras atentam mais às cores do que ao padrão no processo de aprendizado aposemático com sinais visuais.

Borboletas apresentam uma maior variabilidade em termos de sensibilidade espectral do que qualquer outro grupo já estudado. Nos olhos de *Heliconius*, foram identificados quatro

tipos de opsinas com picos de sensibilidade ao redor de 355 nm (UV1), 398 nm (UV2), 470 nm (azul) e 555 nm (ondas longas) (Zaccardi et al. 2006; Briscoe et al. 2010; Yuan et al. 2010). Este sistema visual particular do gênero provavelmente coevoluiu com a pigmentação das asas, onde o amarelo provém da 3-hidroxi-quinurenina (3-OHK) e reflete luz também na faixa do ultravioleta. A duplicação das opsinas UV em *Heliconius*, assim, seria uma adaptação para a discriminação entre parceiros coespecíficos e co-mímicos heteroespecíficos, que utilizam pigmentos para o amarelo que não refletem na faixa do UV e carecem da segunda opsina sensível ao UV nos olhos (Briscoe et al. 2010, Bybee et al. 2012). Em uma comparação das cores análogas (i.e., co-miméticas) entre sete pares miméticos formados cada um por uma forma de *Heliconius numata* (polimórfica) e uma espécie de *Melinaea*, a diferença mais marcante, de fato, se deu no amarelo, cuja discriminação foi maior quando confrontada com modelos visuais das borboletas do que de aves (Llaurens et al. 2014), corroborando as hipóteses derivadas dos estudos com opsinas de que as *Heliconius* utilizam canais crípticos de comunicação visual para o reconhecimento de parceiros como forma de compensação pela convergência mimética.

A sinalização animal pode ser vista como uma corrida armamentista entre sinalizadores como 'manipuladores' e receptores como 'leitores de mente' (Krebs & Dawkins 1984), onde adaptações de um lado são a pressão seletiva para o surgimento de contra-adaptações do outro, e vice-versa. Este conflito de interesses não é regra para todos os sistemas de sinalização-recepção, mas certamente é o quadro que se configura nas relações predador-presa. Em algumas aves, a luz que atinge os fotopigmentos é modificada por reflexão ou filtragem devido a estruturas diversas. Uma destas estruturas são as “gotas de óleo” (*oil droplets*), encontradas dentro das células fotorreceptoras de alguns vertebrados (Liebman & Grand 1975). Filtros intracelulares como as gotas de óleo parecem ter evoluído em

muitos grupos como um meio de afinação da sensibilidade espectral e/ou melhoramento da discriminação de cores (Cronin & Caldwell 2002, Vorobyev 2003, Hunt et al. 2009, Saarinen et al. 2012). O efeito destas estruturas sobre a discriminabilidade entre presas miméticas, contudo, permanece desconhecido.

Quase a totalidade dos esforços de pesquisa sobre mimetismo, isolamento reprodutivo e especiação no gênero *Heliconius* esteve até agora centrada entre o Norte do Brasil e a América Central, compreendendo, portanto, espécies, subespécies e populações essencialmente amazônicas. Contudo, outras regiões, incluindo especialmente a Mata Atlântica, abrigam algumas espécies e subespécies endêmicas para as quais se tem muito pouco conhecimento até mesmo de sua biologia básica. *H. besckei* Ménétriés possui distribuição muito restrita e não se divide em raças geográficas. Típica de locais com altitude superior a 700 metros, ocorre no Sul, Sudeste e, com apenas um registro (Cardoso 2005), Nordeste do Brasil. Em um ramo muito próximo da filogenia está *H. ethilla* Godart, cuja subespécie *narcaea* ocorre no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país. Em um clado afastado, que inclui somente as espécies que executam "cruzamento pupal" (Gilbert 1976, Deinert et al. 1994 e Deinert 2003), está *H. erato*, cuja subespécie *phyllis* Fabricius é mimica de *H. besckei* e pode ser encontrada em abundância desde o Sul até o Nordeste e do Centro-Oeste até a costa litorânea (dados de distribuição para todas as espécies e subespécies podem ser encontrados em Brown 1979). Ainda dentro da família Nymphalidae, porém não mais na subfamília Heliconiinae, existem pelo menos mais três espécies que compartilham o padrão de coloração das asas e vivem em simpatria com alguma das *Heliconius* ocorrentes no Sul do Brasil. *Eresia lansdorfi* Godart (Nymphalinae, Melitaeini) compartilha o "padrão besckei", embora em tonalidades diferentes mesmo à visão humana, principalmente na face ventral das asas. Além das

diferenças em tonalidade, *E. lansdorfi* é menor do que seus modelos de *Heliconius* (cerca de 5cm de envergadura, contra aproximadamente 7 cm de *H. erato* e *H. besckei*), possui claras diferenças na forma das asas (apesar de apresentar o aspecto “alongado” típico de *Heliconius*) e no tipo de voo (observações pessoais). *E. lansdorfi* é encontrada em alguns dos mesmos locais onde ocorrem um ou ambos de seus co-mímicos de *Heliconius* no Sul do Brasil, embora em abundância muito mais baixa, e costuma ovipositar sobre plantas da família Acanthaceae (Biezanko et al. 1974). Embora haja evidências de que outros membros de Melitaeini adquiram proteção química através do sequestro de iridóides de plantas na fase larval, as plantas hospedeiras de *Eresia* não apresentam compostos tóxicos (Wahlberg 2001), podendo-se considerar *E. lansdorfi* um mímico Batesiano. As outras duas espécies de ninfalídeos que mimetizam *Heliconius* do Sul do Brasil compartilham o padrão de coloração com *H. ethilla narcaea* e são ambas membros da subfamília Danainae, na tribo Ithomiini. *Mechanitis lysimnia* Fabricius e *Placidina euryanassa* C. Felder & R. Felder são borboletas impalatáveis que utilizam solanáceas como plantas hospedeiras (Biezanko et al. 1974) e sequestram delas alcalóides pirrolizidínicos (Freitas et al. 1996, Schulz et al. 2004). Ambas são menores do que *H. ethilla narcaea*, tendo a primeira pouco mais de 5 cm de envergadura e a segunda não passando de 7 cm, enquanto que *H. ethilla narcaea* varia de 7cm a 9cm de envergadura. Outras diferenças mais evidentes são a ausência da mancha branca mais distal nas asas anteriores de *P. euryanassa* e o amarelo menos intenso, mais translúcido, nesta mesma espécie.

Desde os trabalhos mais pioneiros, principalmente de Endler (e.g. 1990) que delineavam novos métodos objetivos para a avaliação de cores levando-se em conta diferentes tipos de visão e a natureza ambiente-dependente dos sinais de comunicação, uma série de novas técnicas, aliadas a um maior conjunto de dados experimentais (de aves, em sua maioria) e



teorias desenvolvidas, vem sendo publicada nos últimos anos (e.g. Kelber et al. 2003, Endler et al. 2005, Endler & Mielke 2005, Stoddard & Prum 2008, Renoult et al. 2013, Delhey et al. 2015, Kemp et al. 2015). No presente estudo aplicamos alguns destes novos métodos para analisar as cores envolvidas no mimetismo entre *Heliconius* e as demais espécies acima apresentadas levando-se em conta as possibilidades de discriminação entre cores análogas tanto por predadores em potencial quanto por coespecíficos. Também avaliamos se duas características em particular representam um ganho de eficiência na tarefa de discriminar entre borboletas miméticas: o sistema visual tetracromático de *Heliconius* (comparado ao tricromático, mais ancestral) e os *oil droplets* em aves (comparado a um sistema visual hipotético sem eles).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Amostragem e espectrofotometria*

Foram analisados um total de 44 indivíduos das seis espécies incluídas no estudo (Figura 1), metade pertencendo ao “padrão besckei” (*Heliconius besckei* n=10; *H. erato phyllis* n=10; *Eresia lansdorfi* n=2) e metade ao “padrão ethilla” (*Heliconius ethilla narcaea* n=10; *Mechanitis lysimnia* n=8; *Placidina euryanassa* n=4). Em cada espécie, metade dos indivíduos era macho e metade fêmea. Apenas *P. euryanassa* e *E. lansdorfi* foram capturados em campo, sendo os demais obtidos de criações em laboratório e armazenados em congelador imediatamente após eclosão. Dos indivíduos capturados em campo, foram utilizados apenas aqueles que apresentavam as asas sem perda significativa de escamas ou desbotamento nas regiões de interesse. As proles de laboratório de *Heliconius* resultaram

de diferentes fêmeas capturadas em campo e levadas para insetários e as de *Mechanitis* de duas diferentes desovas coletadas em campo sobre plantas hospedeiras (*Solanum* sp).

O preparo das amostras para espectrofotometria foi feito utilizando-se uma técnica desenvolvida especialmente para esta pesquisa. Isto se deve ao fato das medidas terem sido realizadas em um espectrofotômetro de mesa (modelo Carry 5000 UV-Vis-NIR), diferentemente da grande maioria dos trabalhos que utiliza espectrofotômetros portáteis, de menor custo. O tipo de equipamento que utilizamos dispensa padronizações de ângulo e luminosidade para as medidas, uma vez que a amostra é fixada dentro de uma esfera integradora.

Cada uma das cores medidas foi extraída sempre da mesma região das asas em diferentes indivíduos da mesma espécie e na região mais próxima o possível entre espécies miméticas. Um pequeno pedaço recortado da asa era colado 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 (Figura 2). A amostra assim montada era posicionada dentro do espectrofotômetro e alinhada com o feixe de luz do equipamento, sendo este delimitado por um orifício circular de 2 mm de diâmetro. Uma lâmina montada da mesma forma, porém sem o pedaço de asa, foi analisada para se assegurar que nenhum comprimento de onda específico era refletido pela fita preta sobre a qual era colada a asa.

Foi realizada espectrometria de reflectância difusa com esfera integradora, obtendo-se os valores percentuais de reflectância ao longo do espectro entre 200 e 800 nm, embora posteriormente tenha sido analisada apenas a faixa de 300 a 700, como de praxe para estudos de visão. Para verificar a confiabilidade deste procedimento, quatro amostras de cores diferentes foram medidas três vezes cada pelo mesmo operador das demais medidas,

porém sem saber a identidade de cada amostra. Houve um bom grau de sobreposição entre as curvas de medidas repetidas (DP médio: branco dorsal = 3,32 %; amarelo dorsal = 0,39%; laranja dorsal = 1,57%; vermelho dorsal = 1,42%).

### *Análises computacionais*

Os dados obtidos por espectrofotometria foram processados (*smoothing* de 0.16) para se descartar o ruído característico das medições e analisados integralmente no pacote da plataforma R “*pavo*” (Maia et al. 2013).

Primeiramente foram estimadas as curvas de sensibilidade espectral para cada sistema visual de interesse (Figura S1), baseadas nos modelos descritos em Govardovskii et al. (2000) e em Hart & Vorobyev (2005), utilizando-se os seguintes picos de absorbância: borboleta tetracromática (*Heliconius erato*): 355, 398, 470 e 555 nm; borboleta tricromática (*Dryas iulia*): 385, 470 e 555 nm (Struwe 1972a, 1972b; Frentiu et al. 2007b; Briscoe et al. 2010a); ave tipo UV (*Cyanistes caeruleus*) sem *oil droplets*: 372, 449, 502, 563 nm (Hart & Vorobyev 2005); e com *oil droplets*: 372, 451, 537 e 605 nm (Hart et al. 2000); ave tipo V (*Gallus gallus*) sem *oil droplets*: 418, 453, 507 e 571 nm (Hart & Vorobyev 2005) e com *oil droplets*: 420, 470, 540 e 600 nm (Ödeen & Håstad 2003).

A segunda fase das análises sensoriais consistiu na representação das cores dentro de diagramas de cromaticidade tetracromáticos (Goldsmith 1990; Endler & Mielke 2005, Stoddard & Prum 2008). Um diagrama de cromaticidade consiste no espaço  $(n-1)$ -dimensional, sendo  $n$  o número de classes de fotorreceptores (e portanto de tipos de cones), que engloba todas estímulos teoricamente perceptíveis por um sistema visual em particular, descartando-se o componente acromático, isto é, o *brilho*, ou intensidade do sinal (*matiz* e *saturação*, por outro lado, são componentes cromáticos de um estímulo visual). Pode-se

pensar no diagrama de cromaticidade, assim, como um tipo de “nicho sensorial (visual)” do observador. Neste modelo, as capturas de fótons por cada classe de célula fotorreceptora (os cones) são convertidos em valores relativos. O estímulo máximo possível para um tipo de cone é posicionado no vértice do tetraedro, enquanto que o centro deste polígono corresponde à origem acromática (preto, branco, ou algum tom de cinza). A distância entre o estímulo e a origem acromática, assim, consiste em uma estimativa da *saturação*, isto é, da pureza espectral daquela cor. Já os ângulos formados pelo ponto do estímulo com o plano xy (cones azul, verde e vermelho) e com o eixo z (cone UV) são uma estimativa do matiz, pois indicam em direção a qual cone mais se aproxima o estímulo. Assim, uma cor dentro do diagrama de cromaticidade com  $n$  classes de cones pode ser descrita por meio de um conjunto de coordenadas em número igual a  $n-1$  (duas para tricromatas e três para tetracromatas, por exemplo). Uma propriedade bastante útil de espaços de cores consiste na possibilidade de se calcular a distância euclidiana entre dois pontos ou, no caso de uma amostragem com múltiplos pontos, a área de interseção entre dois conjuntos. Como diferentes observadores possuem diferentes sensibilidades espectrais, um mesmo estímulo de cor (isto é, uma mesma amostra) é localizada em pontos diferentes dentro de diferentes diagrama de cromaticidade. Assim, para estimar o grau em que dois membros de um par mimético ocupam o mesmo "nicho sensorial" foi calculado o volume de sobreposição entre os polígonos formados por cada conjunto de pontos (as diferentes amostras para uma mesma cor e espécie) – método denominado *color volume overlap*, originalmente desenvolvido por Stoddard & Stevens (2011) e implementado no *pavo* (Maia et al. 2013).

As diferenças entre cores também foram calculadas pelo modelo *Receptor Noise* (Vorobyev & Osorio 1998), que utiliza o inverso da razão ruído/sinal ("fração de Weber")

e possibilita a obtenção da distância Euclidiana entre duas capturas absolutas de fótons pelos cones, denominado "contraste cromático" ( $\Delta S$ ). O contraste cromático usualmente é representado em unidades de "diferenças apenas notáveis" (JND's). Valores menores que 1 JND indicam que duas cores são indiscrimináveis e acredita-se que valores menores do que 3 são difíceis de serem distinguidos sob condições decentes de iluminação (Siddiqi et al. 2004, Cassey et al. 2009, Stoddard 2011). A condição ambiental simulada aqui foi a de "luz de dia padrão" (*standard daylight*, disponibilizada no *pavo*), correspondendo à uma clareira iluminada pelo sol, um cenário bastante recorrente nas áreas onde as espécies deste estudo são encontradas.

## RESULTADOS

### *"Color Volume Overlaps"*

Os polígonos dos volumes de sobreposição entre cores análogas dentro dos diagramas de cromaticidade tetracromáticos estão representados na figura 4, acompanhados das curvas de reflectância espectral. Um sumário de todos os volumes de sobreposição pode ser encontrado na figura 5.

No par constituído por *Heliconius besckei* e *H. erato phyllis*, o amarelo dorsal foi a cor com as maiores similaridades para os predadores em potencial, com 13,3% e 17% do volume total sobrepostos em sistemas visuais de aves tipo-V e tipo-UV, respectivamente. Esta mesma cor, contudo, teve uma sobreposição de apenas 1,7% com a visão de borboletas tetracromáticas, indicando uma grande oportunidade de discriminação baseada neste elemento. Na mesma face das asas, a cor vermelha apresentou o padrão inverso: 2,3% e 1,3% de sobreposição para aves tipo-V e tipo-UV, respectivamente, contra 14% de

sobreposição para borboletas tetracromáticas. Na face ventral, o amarelo apresentou sobreposição menor do que 4% para todos os tipos de visão. Já o vermelho teve padrões opostos entre as aves tipo-V e tipo-UV, com 1,9% e 15,6% de sobreposição, respectivamente, e valor intermediário (8%) para borboletas tetracromáticas.

No par formado por *Heliconius ethilla narcaea* e *Mechanitis lysimnia* o amarelo dorsal, juntamente com o laranja ventral, foram as cores mais discerníveis, não exibindo nenhuma sobreposição perante qualquer um dos sistemas visuais testados. Padrões semelhantes ocorreram para o branco dorsal, com ausência de sobreposição para aves tipo-V e tipo-UV e apenas 1,4% para borboletas tetracromáticas; e para o amarelo ventral, com sobreposições não passando de 0,3%. O laranja, assim, foi a cor com maiores índices de similaridade na face dorsal, com 4,5%, 7,7% e 10,5% de sobreposição no sistema visual de borboletas tetracromáticas, aves tipo-V e aves tipo-UV, respectivamente. Na face ventral, o branco apresentou o mesmo grau de sobreposição (5,7%) perante borboletas e aves tipo-UV, se diferenciando muito da visão de aves tipo-V, que teve menos de 0,1% de sobreposição, indicando grande capacidade discriminatória desta cor entre co-mímicos.

Quando olhamos para a cor menos discernível por predadores em potencial no par formado por *Heliconius besckei* e *H. erato phyllis* – o amarelo dorsal – a existência de *oil droplets* nos cones de aves tipo-V e tipo-UV resulta em uma redução de respectivamente 23,12% e 22,37% do volume de sobreposição que ocorreria se os mesmos sistemas visuais não tivessem estes filtros, indicando uma melhora na capacidade discriminatória entre diferentes presas devido a estas estruturas. Para as demais cores deste par mimético, os sentidos de modificação resultantes dos *oil droplets* diferiram entre aves tipo-V e tipo-UV em cada caso, sendo mais fácil se encontrar um padrão associado ao grau de sobreposição no “estado primitivo” dos cones (i.e. sem *oil droplets*): cores que não apresentavam muita

sobreposição tiveram sua discriminabilidade prejudicada pela existência destas estruturas, enquanto que cores que eram muito similares tiveram melhora no grau de discernimento quando *oil droplets* foram incluídos na modelagem. Neste sentido, se destacam os vermelhos ventral e dorsal, com redução de respectivamente 28,11% e 83,95% para aves tipo-UV.

As duas cores com maiores sobreposições entre *Heliconius ehtilla narcaea* e *Mechanitis lysimnia* também tiveram efeitos dos *oil droplets* em diferentes sentidos dependendo da cor e do sistema visual considerado. O laranja dorsal, por exemplo, teve um acréscimo de 108% na sobreposição para aves tipo-V e de 218% para aves tipo-UV. Já os efeitos sobre o branco ventral foram a redução de 5,2% para menos de 0,1% de sobreposição considerando aves tipo-V, indicando um incremento na capacidade discriminatória, e um aumento de 4,2% para 5,7% de sobreposição considerando aves tipo-UV.

#### *“Just Noticeable Differences”*

As distâncias entre cores análogas sob o modelo *receptor-noise* estão apresentadas na tabela 3 em unidades de JNDs para cada um dos seis modelos visuais investigados.

Entre *Heliconius besckei* e *H. erato phyllis* o vermelho é “mais mimético” do que o amarelo, apresentando distâncias menores do que 3 JNDs em ambas as faces e perante todos os modelos visuais. Os amarelos apresentaram este grau de similaridade apenas perante a visão de aves tipo-V. No outro extremo, o modelo visual de borboletas tetracromáticas é o que melhor discrimina os amarelos neste par. Quando comparadas *H. besckei* e *Eresia lansdorfi*, o vermelho ventral foi a cor mais similar, com distâncias menores do que 3 JNDs perante ambos os tipos de visão de borboletas. A visão de borboletas tetracromáticas, contudo, é ao mesmo tempo a que melhor discrimina todas as

demais cores neste par mimético. Este padrão se repetiu na comparação entre *H. erato phyllis* e *E. lansdorfi*.

Em *Heliconius ethilla narcaea* e *Mechanitis lysimnia* a cor mais mimética foi o branco, em ambas as faces, exibindo distâncias menores do que 1 JND ou muito próximas deste valor perante todos os modelos visuais, seguido pelo amarelo ventral, com distâncias menores do que 3 JNDs perante todos os modelos visuais menos o de borboletas tetracromáticas. Neste par mimético, se destaca a distância obtida para o amarelo dorsal, com média de 13,48 JNDs para borboletas tetracromáticas e mantendo ainda acima de 9 unidades para borboletas tricromáticas e aves tipo-UV. Além desta cor, o sistema visual de borboletas tetracromáticas também é o que melhor distingue o amarelo e o laranja ventrais entre os co-mímicos. Quando *Heliconius ethilla narcaea* foi comparada com *Placidina euryanassa* as diferenças foram maiores e novamente se destacou a capacidade discriminatória do sistema visual de borboletas tetracromáticas para o amarelo dorsal, com valor médio de 15,01 JNDs. A cor mais semelhante, por outro lado, foi o amarelo ventral. Na comparação de *P. euryanassa* com *Mechanitis lysimnia*, contudo, o quadro foi bem diferente, com ambos os amarelos, dorsal e ventral, sendo muito mais similares perante todos tipos de observadores. O único sistema visual com valores acima de 3 JNDs para estas cores foi o de borboletas tetracromáticas, mas ainda assim a distância para o amarelo dorsal foi muito menor do que nas comparações anteriores (média de 3,53 JNDs). Outro destaque neste par mimético foi a única vez em que o sistema visual tricromáticas de borboletas se apresentou como o mais eficiente em discriminar uma cor, no caso, o laranja ventral. O branco de *P. euryanassa* não foi analisado por não se encontrar na forma de uma mancha análoga aos outros dois membros do mesmo padrão (ver Figura 1).



Nesta análise foi possível comparar os três pares de sistemas visuais que diferem em dois “incrementos sensoriais”: o quarto cone das borboletas e os *oil droplets* das aves. O sistema tetracromático de visão em borboletas se mostrou mais eficiente do que o tricromático para discriminar 25 dos 26 pares de cores analisados. A única exceção se deu justamente no caso em que ambos os membros possuem visão tricromática – o par constituído por *Mechanitis lysimnia* e *Placidina euryanassa*, no qual o laranja ventral pode ser mais bem distinguido por este tipo de visão do que por qualquer outro testado. A existência de *oil droplets* em aves do tipo-V aumentou a capacidade discriminatória em 12 (46,15%) cores em relação a um sistema hipotético sem estes filtros, diminuindo em 13 e mantendo a mesma em uma cor. Em aves tipo-UV, foram 17 (65,38 %) cores com melhor discriminação na presença de *oil droplets*, contra 9 que tiveram sua distância reduzida.

## DISCUSSÃO

### *O “padrão besckei”*

O par intragenérico (*Heliconius besckei* – *H. erato phyllis*) apresentou de forma acentuada maior similaridade de cores do que qualquer um dos pares intergenéricos analisados, sugerindo restrições históricas para o aperfeiçoamento do mimetismo entre espécies menos aparentadas (Kikuchi & Pfenning 2013). Além da possibilidade de se utilizar genes homólogos para o desenvolvimento de padrões de coloração miméticos, é possível que *H. besckei* tenha adquirido genes de outros membros do gênero por hibridação, incorporados em seu genoma após seleção natural, um fenômeno denominado *introgressão* e que tem se mostrado recorrente neste grupo (Pardo-Diaz et al. 2012). Este par mimético foi também o único a possuir todas as cores de seu padrão indiscrimináveis para um mesmo observador,

sugerindo que aves com visão tipo-V sejam agentes seletivos mais importantes para o mimetismo do que aves tipo-UV. Apesar de existirem poucos estudos referentes às espécies de aves que atuam como predadoras destas borboletas, pássaros da família Tyrannidae, tidos como importantes insetívoros neotropicais e agentes seletivos do mimetismo Mülleriano em borboletas (Pinheiro 2003), possuem visão tipo-V (Ödeen and Håstad 2003). Nas áreas de simpatria das espécies aqui estudadas são comuns pelo menos dois tiranídeos: o bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*) e o suiriri-cavaleiro (*Machetornis rixosa*) (observações pessoais).

Apesar do alto nível de similaridade, contudo, é possível que o reconhecimento de parceiros neste par mimético seja auxiliado por diferenças crípticas nas cores. Se este for o caso, nossos dados apontam para o amarelo dorsal como principal sinalizador da identidade específica. As duas diferentes análises executadas aqui geraram padrões coerentes no sentido de ser esta a cor mais distinguível pela visão das próprias *Heliconius* e ao mesmo tempo a menos distinguível pela visão das aves. O amarelo ventral exibiu padrão semelhante, mesmo que não tão acentuado. Ainda na face dorsal, o vermelho se apresentou altamente mimético perante qualquer observador pelo modelo *receptor-noise*, embora a sobreposição no espaço de cores tenha sido alta apenas para a visão de *Heliconius*. Não faz sentido, portanto, acreditar que esta cor seja utilizada no reconhecimento de parceiros entre *H. besckei* e *H. erato phyllis* (o que não significa que ela não tenha papel na atração sexual). A mancha vermelha dorsal deste padrão de coloração já se revelou um importante sinal aposemático (Benson 1972, Finkbeiner et al. 2014) e os dados aqui encontrados apontam uma maior convergência mimética para este elemento do que para outros do mesmo padrão.

As comparações de ambas as espécies de *Heliconius* acima com seu mímico *Eresia lansdorfi* revelaram um mesmo padrão para três das quatro cores analisadas: todas são passíveis de discriminação por qualquer observador e o melhor sistema visual para este fim é o das borboletas tetracromáticas. Isto sugere que a interferência reprodutiva em potencial por confusão de sinais é amenizada mais pelas *Heliconius* do que por *E. lansdorfi*. A única cor que apresentou grande similaridade foi o vermelho ventral. As manchas ventrais ficam expostas quando o indivíduo está em repouso, com as asas fechadas, e, portanto mais vulnerável, enquanto que as dorsais normalmente são exibidas em movimento, dificultando a detecção de diferenças sutis. A seleção natural resultante da predação, assim, pode ter priorizado a convergência de elementos da face ventral das asas (Finkbeiner et al. 2014), principalmente da mancha vermelha, que é a mais evidente nesta face. Outra interpretação possível é que tenha simplesmente havido menos restrições evolutivas para o desenvolvimento do mimetismo nesta cor do que nas demais, que podem ter divergido de *Eresia* sob seleção para reconhecimento específico nas *Heliconius*.

#### O “padrão ethilla”

As comparações de *Heliconius ethilla narcaea* com os dois co-mímicos analisados destacam novamente a função do amarelo dorsal no reconhecimento específico, uma vez que esta cor apresentou valores muito mais altos com a visão de borboletas tetracromáticas do que todos os demais obtidos em unidades de JND, além de não ter havido nenhuma sobreposição nos espaços de cores. É apenas com esta cor também que se nota uma maior distância fenotípica entre co-mímicos intergenéricos do que entre os membros do par intragenérico. Além disso, a sua discriminabilidade cai bruscamente quando são comparados *Mechanitis lysimnia* e *Placidina euryanassa* entre si, reforçando a hipótese de que as diferenças no amarelo dorsal e o sistema visual tetracromático sejam coadaptados

especialmente para tornar diferenciáveis *Heliconius* de outros gêneros (Briscoe *et al* 2010, Bybee *et al.* 2012, Llaurens *et al.* 2014). Apesar de se conhecer pouco sobre a comunicação visual de *M lysimnia* e *P. euryanassa*, foi saliente a melhor discriminabilidade do laranja ventral pelo sistema tricromático. Este foi o único par mimético para o qual a visão tricromática se mostrou mais eficiente em discriminar alguma cor. Talvez o laranja da face ventral das asas seja importante para o reconhecimento específico entre estas espécies.

### *Incrementos sensoriais*

A presença do quarto cone em borboletas teve um efeito claro sobre a discriminabilidade entre co-mímicos. Nossos dados, assim, indicam uma vantagem adaptativa desta característica na tarefa de reconhecer coespecíficos visualmente e evitar ou amenizar a interferência reprodutiva entre co-mímicos. Da mesma forma, nossa análise comparada entre dois co-mímicos de *Heliconius ethilla* sugere que o sistema tricromático seja o mais ajustado para contextos de interação e reconhecimento visual entre as espécies que o possuem. Os *oil droplets* em aves, por outro lado, não apresentaram melhora significativa na tarefa de discriminar diferentes tipos de presa miméticas em cerca da metade dos casos aqui analisados. Estes filtros, portanto, parecem ter evoluído sob outras pressões seletivas, como a comunicação sexual. Chama à atenção, no entanto, que nos dois únicos casos de mimetismo Batesiano que analisamos – *Eresia lansdorfi* com *H. besckei* ou com *H. erato phyllis* – a cor mais difícil de ser distinguida entre mímico e modelo, o vermelho ventral, teve aumento de discriminabilidade pela presença dos *oil droplets* em ambos os tipos de aves. Não estamos sugerindo que estes filtros tenham sido originados e/ou mantidos por seleção natural devido à vantagem em se reconhecer esta presa palatável em particular. Vista do outro lado, contudo, esta corrida armamentista se torna plausível: o vermelho ventral de *E. lansdorfi* teria sofrido seleção mais rigorosa para convergência com seus

modelos impalatáveis do gênero *Heliconius* devido à eficiência da visão de seus predadores em discriminá-la, somado à maior exposição deste elemento em postura de repouso.

### *Visão geral*

Os resultados deste estudo corroboram outros recentes (Briscoe et al. 2010, Bybee et al. 2012, Llaurens et al. 2014) que indicam a importância destacada do amarelo das asas de *Heliconius* como sinal críptico de reconhecimento específico frente à convergência mimética, expandindo os exemplos para espécies e populações do Sul do Brasil. Além disso, eles abrem a possibilidade de que o amarelo, principalmente o dorsal, seja utilizado não apenas para discriminações intergenéricas, também para a discriminação entre cómicos dentro do gênero *Heliconius*. Em outro estudo (Klein & Araújo 2013), machos de *H. besckei* e *H. erato phyllis* apresentaram a barra amarela dorsal maior do que as fêmeas e alometria negativa para este traço (machos menores continham barras amarelas proporcionalmente maiores) o que pode indicar seleção sexual para o tamanho deste caractere (Bonduriansky 2007). O amarelo da barra posterior das asas, assim, pode funcionar tanto para o reconhecimento quanto para a escolha de parceiros. O uso de um mesmo traço nestas duas etapas da comunicação sexual é comum em animais e às vezes a preferência das fêmeas por um traço em particular nos machos é dirigida por uma predisposição sensorial mais generalizada sobre esta mesma característica, como por exemplo, um critério de reconhecimento específico (Ryan & Rand 1993).

Pressões seletivas para diferentes funções sobre as asas de uma mesma espécie podem resultar em um padrão denominado ‘partição de sinais’ (Oliver et al. 2009). Esta partição, comumente se dá entre as faces dorsal e ventral das asas (Rutowski et al. 2010). É válido

considerar possível, contudo, a possibilidade de partição de sinais sobre uma mesma face das asas se as espécies receptoras dos sinais em cada função específica tiverem diferentes sensibilidades visuais. Os diferentes graus de discriminabilidade dependentes do sistema visual demonstrados aqui, com padrões algumas vezes opostos entre predador e presa, é condizente com este cenário.

A discriminação de cores das asas entre borboletas co-miméticas é extremamente útil para as próprias borboletas, dado o tempo e energia gastos em aproximações, perseguições e cortejos errôneos quando isto não ocorre. Para as aves, por outro lado, esta importância é secundária, pelo menos se tratando de mímicos Müllerianos com graus muito próximos de impalatabilidade. Na verdade, é inclusive vantajoso para as aves (e quaisquer outros predadores visualmente guiados) que espécies miméticas sejam vistas como “a mesma coisa”, pois esta é a base da facilitação de aprendizado na qual se sustenta a teoria do mimetismo Mülleriano. Entre mímicos intergenéricos, contudo, é provável que haja preferências dos predadores por um ou outro membro de um par ou complexo mimético derivadas de diferenças no grau ou tipo de toxicidade (Speed & Turner 1999), nos comportamentos de fuga (Pinheiro & Freitas 2014) ou no valor nutricional (Pulliam 1975). Assim, por duas diferentes razões – menor aprendizado e perda da chance de escolha – é válido se considerar os custos dos *oil droplets* em termos de discriminação de presas quando estes pioram sua eficiência. Os casos particulares aqui analisados podem ser representativos de um grupo maior de objetos (principalmente alimentos) que se tornaram menos discrimináveis pela aquisição destas estruturas oculares.

A partir das análises comparadas executadas neste estudo, testes de hipóteses comportamentais casos-específicos poderão ser delineados com maior embasamento. A discriminação visual em animais tem como apenas uma de suas etapas a percepção

sensorial. Esta é seguida por processos psicofisiológicos que, por fim, poderão resultar em ‘escolha’ ou ‘reconhecimento’ propriamente ditos. Além disso, a eficiência de sinais visuais ‘fixos’, como as cores e seu padrão geométrico e espacial, podem ser modulados por exibições, posturas e movimentos que otimizem ou dificultem a detecção de diferenças sutis. Por fim, o caráter multimodal da comunicação animal deve ser levado em conta. Para isso, contudo, é pertinente que se estabeleça uma relação empírica entre as propriedades físicas de diferentes sinais (químicos, sonoros, mecânicos ou visuais) e seu processamento por organismos ecologicamente relevantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Somos gratos aos integrantes do Laboratório de Genética Ecológica que colaboraram com as capturas e a criação de borboletas e lagartas durante este estudo (Ana Carolina Bahi Aymone, Ana Carolina Silva, Etiele Senna Luciana Silva, Bruna Missagia, Janaína De Nardin, Marcelo Costa e Pietro Pollo). Agradecemos também a Aline Quadros pelo auxílio na plataforma *R* e a Marc Théry por nos indicar o software *pavo*. Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida a um dos autores (ALK).

## **REFERÊNCIAS**

Aronsson M, Gamberale-Stille G (2008) Domestic chicks primarily attend to colour, not pattern, when learning an aposematic coloration. *Animal Behavior* 75:417-423.

Bates HW (1862) Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley: Lepidoptera: Heliconidae. Transactions of the Linnean Society of London 25 (1862) 495-566.

Benson WW (1972) Natural selection for Miillerian mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. Science, 176(4037), 936-939.

Biezanko CM (1974) Plantas y otras sustâncias alimentícias de las orugas de los lepidópteros uruguayos. Revista do Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, v. 4, n. 2, p.107-148.

Bonduriansky R (2007). Sexual selection and allometry: a critical reappraisal of the evidence and ideas. Evolution, 61(4), 838-849.

Briscoe AD, Bybee SM, Bernard GD, Yuan F, Sison-Mangus MP, Reed, RD, Warren AD, Llorente-Bousquets J, Chiao C (2010). Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:3628–3633.

Brower LP, Brower JVZ, Collins CT (1963) Experimental studies of mimicry. 7. Relative palatability and Mullerian mimicry among Neotropical butterflies of the subfamily Heliconiinae. Zoologica 48: 65–84.

Brown KS (1979) Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais. Unicamp, Campinas. Monografia 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. Am. Nat. 179:38–51.

Cardoso MZ (2005) New localities for *Heliconius besckei* Ménériés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. Neotropical Entomology 34(6): 1007-1008.

Cassey P, Ewen JG, Marshall NJ, Vorobyev M, Blackburn TM, Hauber ME (2009). Are avian eggshell colours effective intraspecific communication signals in the Muscicapoidea? A perceptual modelling approach. Ibis, 151(4), 689-698.



Cronin TW, Caldwell RL (2002) Tuning of photoreceptor function in three mantis shrimp species that inhabit a range of depths. II. Filter pigments. *Journal of Comparative Physiology A* 188:187–197.

Darwin C (1859). *The origin of species by means of natural selection: or, the preservation of favored races in the struggle for life*. W. F. Bynum (Ed.). AL Burt.

Deinert EI (2003) Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (eds) *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 91-108.

Deinert EI, Longino JT, Gilbert LE (1994) Mate competition in butterflies. *Nature* 370: 23–24.

Delhey K, Delhey V, Kempenaers B, Petters A (2015) A practical framework to analyze variation in animal colors using visual models. *Behavioral Ecology* 26(2), 367–375.

Emsley MG (1965) Speciation in *Heliconius* (Lep., Nymphalidae): morphology and geographic distribution. *Zoologica NY* 50: 191-254.

Endler JA (1990) On the measurement and classification of colour in studies of animal color patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 41:315–352.

Endler JA, Mielke PW (2005) Comparing entire colour patterns as birds see them. *Biological Journal of the Linnean Society* 86:405–431.

Endler JA, Westcott DA, Madden JR, Robson T (2005) Animal visual systems and the evolution of color patterns: sensory processing illuminates signal evolution. *Evolution* 59:1795–1818.

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? *J. Evol. Biol.* 21: 749-760.

Finkbeiner SD, Briscoe AD, Reed RD (2014) Warning signals are seductive: Relative contributions of color and pattern to predator avoidance and mate attraction in *Heliconius* butterflies. *Evolution*, 68(12), 3410-3420.

- Freitas AVL, Trigo JR, Brown KS, Witte L, Hartmann T, Barata LES (1996) Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology* 7: 61-67.
- Frentiu FD, Bernard GD, Sison-Mangus MP, Brower AVZ, Briscoe AD (2007) Gene duplication is an evolutionary mechanism for expanding spectral diversity in the long-wavelength photopigments of butterflies. *Molecular biology and evolution*, 24(9), 2016-2028.
- Garland T (2014) Trade-offs. *Current Biology* 24(2):R60-R61
- Gilbert LE (1976) Postmating female odor in *Heliconius* Butterflies: male-contributed anti-aphrodisiac. *Science* 193: 419–420.
- Goldsmith TH (1990) Optimization, constraint, and history in the evolution of eyes. *Quarterly Review of Biology*, 281-322.
- Govardovskii VI, Fyhrquist N, Reuter T, Kuzmin DG, Donner K (2000) In search of the visual pigment template. *Visual Neuroscience* 17:509–528.
- Gröning J, Hochkirch A (2008) Reproductive interference between animal species. *Quart. Rev. Biol.* 83 (3): 257-282.
- Hart NS, Vorobyev M (2005) Modelling oil droplet absorption spectra and spectral sensitivities of bird cone photoreceptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 191(4), 381-392.
- Hart NS, Partridge JC, Cuthill IC, Bennett AT (2000) Visual pigments, oil droplets, ocular media and cone photoreceptor distribution in two species of passerine bird: the blue tit (*Parus caeruleus* L.) and the blackbird (*Turdus merula* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 186(4), 375-387.
- Hoskin CJ, & Higgie, M (2010) Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecology Letters*, 13(4), 409-420.

- Hunt DML, Carvalho S, Cowing JA, Davies WL (2009) Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:2941–2955.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*. 411: 302-305.
- Jiggins CD, Estrada C, Rodrigues A (2004) Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconius melpomene* Linnaeus. *J. Evol. Biol.* 17: 680-691.
- Kelber A, Vorobyev M, Osorio D (2003). Animal colour vision: behavioral tests and physiological concepts. *Biological Reviews* 78: 81–118.
- Kemp DJ, Herberstein ME, Fleishman LJ, Endler JA, Bennett AT, Dyer AG, Hart NS, Marshall J, Whiting MJ (2015) An integrative framework for the appraisal of coloration in nature. *American Naturalist* 185(6):705-24.
- Kikuchi DW, Pfennig DW (2013). Imperfect mimicry and the limits of natural selection. *The Quarterly review of biology*, 88(4), 297-315.
- Klein AL, Araújo AM (2013). Sexual size dimorphism in the color pattern elements of two mimetic *Heliconius* butterflies. *Neotropical entomology*, 42(6), 600-606.
- Krebs JR, Dawkins R (1984) Animal signals: mind-reading and manipulation. *Behavioural Ecology: an evolutionary approach*, 2, 380-402.
- Liebman P A, Granda AM (1975) Super dense carotenoid spectra resolved in single cone oil droplets. *Nature* 253:370–372.
- Llaurens V, Joron M, Thery M (2014) Cryptic differences in colour among Mullerian mimics: how can the visual capacities of predators and prey shape the evolution of wing colours. *J. Evol. Biol.* 27: 531–540.
- Maia R, Eliason CM, Bitton PP, Doucet SM, Shawkey MD (2013) pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(10), 906-913.

McMillan WO, Jiggins CD, Mallet J (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8628-8633.

Merrill RM, Gompert Z, Dembeck LM, Kronforst M, McMillan WO, Jiggins CD (2011) Mate preference across the speciation continuum in a clade of mimetic butterflies. *Evolution* 65(5): 1489-1500.

Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak KM, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RW, Yu Q (2015) The diversification of *Heliconius* butterflies: what have we learned in 150 years? *J Evol Biol.* 28(8):1417-38

Müller F (1879) *Ituna* and *Thyridia*: a remarkable case of mimicry in butterflies. *Trans. Entomol. Soc. Lond* 1879:xx–xxix

Muñoz AG, Salazar C, Castaño J, Jiggins CD, Linares M (2010) Multiple sources of reproductive isolation in a bimodal butterfly hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1312-1320.

Ödeen A, Håstad O (2003). Complex distribution of avian color vision systems revealed by sequencing the SWS1 opsin from total DNA. *Molecular biology and evolution*, 20(6), 855-861.

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.

Pardo-Diaz C, Salazar C, Baxter SW, Merot C, Figueiredo-Ready W, Joron M, McMillan WO, Jiggins CD (2012) Adaptive introgression across species boundaries in *Heliconius* butterflies.

Pinheiro CE (2003) Does Müllerian mimicry work in nature? Experiments with butterflies and birds (*Tyrannidae*) 1. *Biotropica*, 35(3), 356-364.

Pinheiro CEG, Freitas AVL (2014) Some Possible Cases of Escape Mimicry in Neotropical Butterflies. *Neotropical Entomology*, 43(5), 393-398.

- Pulliam HR (1975) Diet optimization with nutrient constraints. *The American Naturalist* 109: 765-768
- Renoult JP, Courtiol A, Schaefer M (2013) A novel framework to study colour signalling to multiple species. *Functional Ecology* 27(3): 718–729.
- Rutowski RL, Nahm AC, Macedonia JM (2010) Iridescent hindwing patches in the Pipevine Swallowtail: differences in dorsal and ventral surfaces relate to signal function and context. *Functional ecology*,24(4), 767-775.
- Ryan MJ, Rand AS (1993) Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution*, 647-657.
- Saarinen P, Pahlberg J, Herczeg G, Viljanen M, Karjalainen M, Shikano T, Merilä J, Donner K (2012) Spectral tuning by selective chromophore uptake in rods and cones of eight populations of nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*). *Journal of Experimental Biology* 215:2760–2773.
- Schulz S, Beccaloni G, Brown KS, Boppré M, Freitas AVL, Ockenfels P, Trigo JR (2004) Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochemical systematics and ecology*, 32(8), 699-713.
- Siddiqi A, Cronin TW, Loew ER, Vorobyev M, Summers K (2004) Interspecific and intraspecific views of color signals in the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*. *Journal of Experimental Biology*, 207(14), 2471-2485.
- Silberglied RE (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.
- Smith JM, Harper D (2003). *Animal signals*. Oxford University Press.
- Speed MP, Turner JR (1999) Learning and memory in mimicry: II. Do we understand the mimicry spectrum? *Biological Journal of the Linnean Society*, 67(3), 281-312.

- Stoddard MC, Stevens M (2011) Avian vision and the evolution of egg color mimicry in the common cuckoo. *Evolution*, 65(7), 2004-2013.
- Struwe G (1972) Spectral sensitivity of single photoreceptors in the compound eye of a tropical butterfly (*Heliconius numata*). *Journal of comparative physiology*, 79(2), 197-201.
- Struwe G (1972) Spectral sensitivity of the compound eye in butterflies (*Heliconius*). *Journal of comparative physiology*, 79(2), 191-196.
- Turner JR (1976) Adaptive radiation and convergence in subdivisions of the butterfly genus *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 58(4): 297-308.
- Vane-Wright RI, Boppré M (1993) Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 340: 197-205.
- Vorobyev M (2003) Coloured oil droplets enhance colour discrimination. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:1255–1261.
- Vorobyev M, Osorio D (1998) Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:351–358.
- Wahlberg N (2001) The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 55, 522–537.
- Walker TJ (1974) Character displacement and acoustic insects. *American Zoologist* 14(4):1137–1150.
- Yuan F, Bernard GD, Le J, Briscoe AD (2010) Contrasting modes of evolution of the visual pigments in *Heliconius* butterflies. *Mol. Biol. Evol.* 27: 2392–2405.
- Zaccardi G, Kelber A, Sison-Mangus MP, Briscoe AD (2006) Opsin expression in the eyes of *Heliconius erato*. *Perception* 35:142–143.

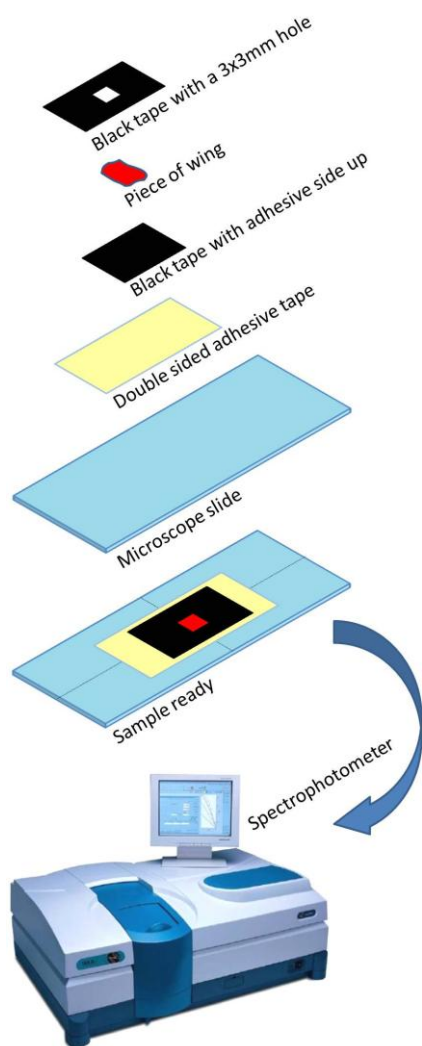
**Table 1** Just-noticeable differences (JND's) between wing color patches on the two members of each mimetic pair, according do different visual models. JND's are presented for mean value and standard deviation. Values  $\leq 3$  are in bold, indicating that colors are difficult to distinguish. For the remaining, the bigger value of each line is underlined, indicating the visual model that best discriminate that color.

	Color	Trichromatic Butterfly	Tetrachromatic Butterfly	Bird V-type without OD	Normal Bird V-type	Bird UV-type without OD	Normal Bird UV-type
<i>H. besckei</i> <i>H. erato phyllis</i>	Dorsal yellow	4.38 (± 3.03)	<u>5.81 (± 3.97)</u>	<b>1.64 (± 1.17)</b>	<b>1.50 (± 1.08)</b>	4.74 (± 3.18)	4.72 (± 3.17)
	Dorsal red	<b>1.71 (± 0.97)</b>	<b>2.15 (± 1.17)</b>	<b>2.50 (± 1.60)</b>	<b>2.76 (± 1.71)</b>	<b>2.39 (± 1.42)</b>	<b>2.67 (± 1.63)</b>
	Ventral yellow	3.58 (± 2.16)	<u>5.21 (± 3.16)</u>	<b>2.69 (± 1.51)</b>	<b>2.57 (± 1.42)</b>	3.97 (± 2.24)	4.07 (± 2.27)
	Ventral red	<b>1.54 (± 0.84)</b>	<b>1.99 (± 1.03)</b>	<b>2.09 (± 1.34)</b>	<b>2.57 (± 1.76)</b>	<b>2.13 (± 1.23)</b>	<b>2.60 (± 1.64)</b>
<i>H. besckei</i> <i>E. lansdorfi</i>	Dorsal yellow	5.98 (± 2.79)	<u>8.42 (± 2.93)</u>	4.14 (± 0.83)	4.43 (± 0.90)	5.74 (± 2.32)	6.01 (± 2.11)
	Dorsal red	5.79 (± 0.72)	<u>9.24 (± 1.09)</u>	7.29 (± 0.75)	6.22 (± 0.53)	7.97 (± 0.72)	7.37 (± 0.72)
	Ventral yellow	5.77 (± 2.48)	<u>8.03 (± 3.74)</u>	4.28 (± 1.51)	4.19 (± 1.14)	5.71 (± 2.55)	5.57 (± 2.31)
	Ventral red	<b>1.93 (± 0.94)</b>	<b>2.48 (± 1.03)</b>	3.41 (± 1.78)	4.42 (± 2.32)	3.08 (± 1.46)	4.52 (± 2.16)
<i>H. erato phyllis</i> <i>E. lansdorfi</i>	Dorsal yellow	4.46 (± 1.69)	<u>6.71 (± 1.99)</u>	3.86 (± 0.69)	4.22 (± 0.89)	4.39 (± 1.79)	4.91 (± 2.02)
	Dorsal red	6.09 (± 0.81)	<u>9.58 (± 1.13)</u>	7.59 (± 0.88)	6.62 (± 0.77)	8.19 (± 0.87)	7.76 (± 0.89)
	Ventral yellow	6.34 (± 3.52)	<u>9.20 (± 5.09)</u>	4.96 (± 2.28)	4.69 (± 1.92)	6.37 (± 3.66)	6.24 (± 3.50)
	Ventral red	<b>1.72 (± 0.69)</b>	<b>2.42 (± 1.01)</b>	<b>2.48 (± 1.16)</b>	3.21 (± 1.56)	<b>2.57 (± 0.95)</b>	3.70 (± 1.39)
<i>H. ethilla narcaea</i> <i>M. lysimnia</i>	Dorsal white	<b>0.75 (± 0.47)</b>	<b>1.10 (± 0.72)</b>	<b>0.70 (± 0.50)</b>	<b>0.72 (± 0.48)</b>	<b>0.93 (± 0.59)</b>	<b>1.00 (± 0.62)</b>
	Dorsal yellow	9.54 (± 4.00)	<u>13.48 (± 5.62)</u>	4.24 (± 1.63)	3.89 (± 1.48)	10.12 (± 4.27)	9.93 (± 4.17)
	Dorsal orange	3.64 (± 2.14)	5.28 (± 3.11)	4.92 (± 3.11)	4.89 (± 3.17)	4.91 (± 2.93)	<u>5.40 (± 3.39)</u>
	Ventral white	<b>0.59 (± 0.33)</b>	<b>0.90 (± 0.50)</b>	<b>0.63 (± 0.34)</b>	<b>0.63 (± 0.30)</b>	<b>0.72 (± 0.37)</b>	<b>0.77 (± 0.37)</b>
	Ventral yellow	<b>2.22 (± 1.35)</b>	<u>3.29 (± 2.08)</u>	<b>2.00 (± 1.17)</b>	<b>1.94 (± 1.11)</b>	<b>2.49 (± 1.36)</b>	<b>2.59 (± 1.38)</b>
	Ventral orange	4.63 (± 1.14)	<u>7.18 (± 1.77)</u>	4.93 (± 1.94)	4.51 (± 1.90)	5.83 (± 1.66)	5.81 (± 1.99)
<i>H. ethilla narcaea</i> <i>P. euryanassa</i>	Dorsal yellow	10.75 (± 4.17)	<u>15.01 (± 5.84)</u>	5.24 (± 1.74)	4.81 (± 1.51)	10.99 (± 4.39)	10.67 (± 4.26)
	Dorsal orange	5.23 (± 2.47)	7.26 (± 3.71)	7.36 (± 3.75)	7.59 (± 3.67)	7.04 (± 3.47)	<u>7.96 (± 3.96)</u>
	Ventral yellow	<b>2.81 (± 1.45)</b>	<u>4.30 (± 2.16)</u>	<b>2.91 (± 1.36)</b>	3.02 (± 1.29)	3.24 (± 1.64)	3.57 (± 1.74)
	Ventral orange	5.66 (± 1.69)	<u>8.98 (± 2.76)</u>	5.14 (± 2.04)	4.72 (± 1.77)	6.96 (± 2.15)	6.82 (± 2.25)
<i>M. lysimnia</i> <i>P. euryanassa</i>	Dorsal yellow	<b>2.36 (± 1.43)</b>	<u>3.53 (± 2.03)</u>	<b>2.02 (± 1.12)</b>	<b>1.99 (± 1.01)</b>	<b>2.42 (± 1.27)</b>	<b>2.43 (± 1.19)</b>
	Dorsal orange	3.42 (± 1.77)	4.77 (± 2.42)	4.86 (± 2.89)	5.10 (± 3.07)	4.63 (± 2.52)	<u>5.33 (± 3.07)</u>
	Ventral yellow	<b>2.34 (± 1.19)</b>	<u>3.59 (± 1.83)</u>	<b>2.16 (± 0.89)</b>	<b>2.25 (± 0.89)</b>	<b>2.67 (± 1.38)</b>	<b>2.93 (± 1.50)</b>
	Ventral orange	<u>5.66 (± 1.69)</u>	3.73 (± 1.40)	<b>2.60 (± 1.54)</b>	<b>2.66 (± 1.56)</b>	3.12 (± 1.27)	3.35 (± 1.44)



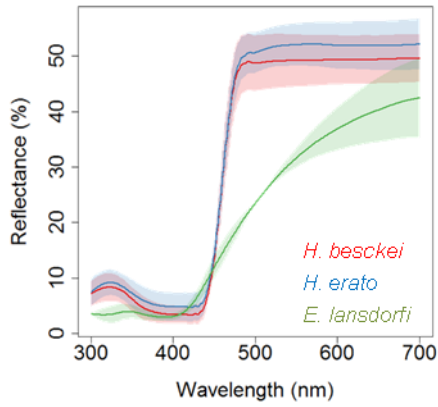


**Figure 1** Color patterns analyzed (left size, dorsal view; right size, ventral view). A and B, *Heliconius besckei*; C and D, *Heliconius erato phyllis*; E and F, *Eresia lansdorfi*; G and H, *Heliconius ethilla narcaea*; I and J, *Mechanitis lysimnia*; K and L, *Pladicina euryanassa*. Scale: 1 cm.

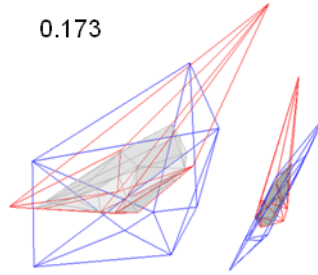


**Figure 2** Sample preparation for spectrophotometry.

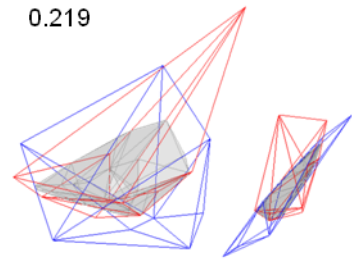
**Dorsal Yellow (“besckeï” pattern)**



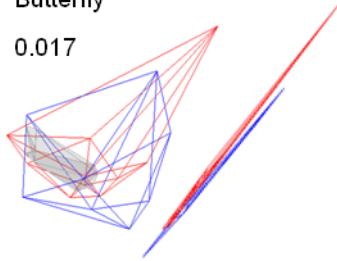
Bird V-type  
without OD  
0.173



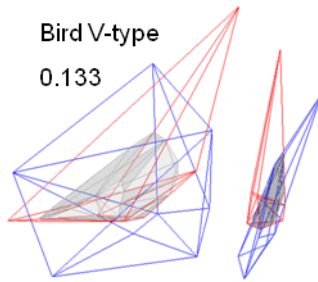
Bird UV-type  
without OD  
0.219



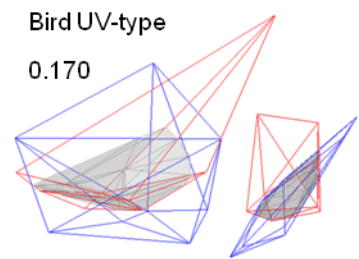
Butterfly  
0.017



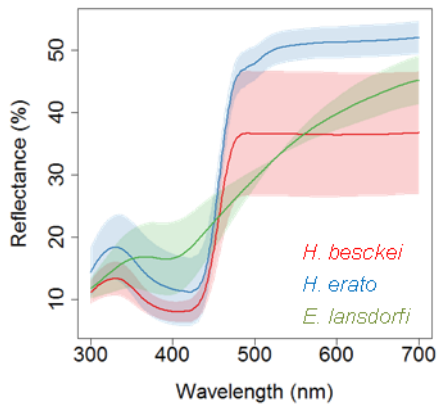
Bird V-type  
0.133



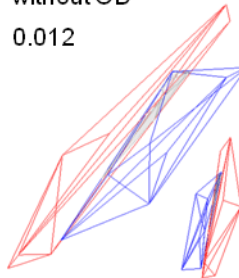
Bird UV-type  
0.170



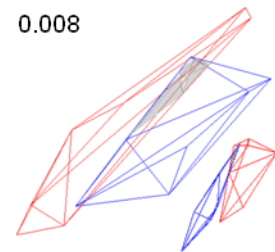
**Ventral Yellow (“besckeï” pattern)**



Bird V-type  
without OD  
0.012



Bird UV-type  
without OD  
0.008



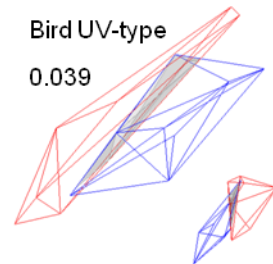
Butterfly  
0.031



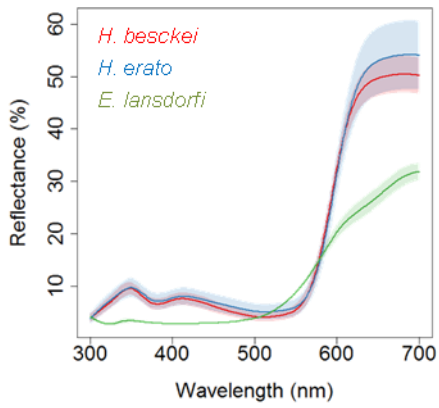
Bird V-type  
0.018



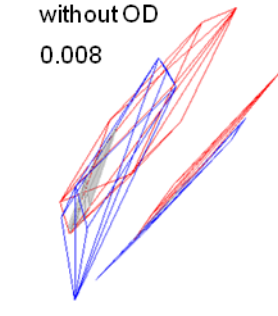
Bird UV-type  
0.039



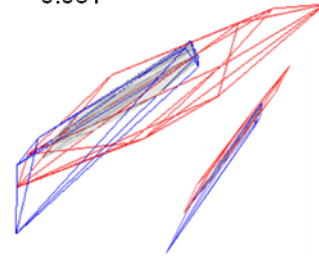
### Dorsal Red ("besckei" pattern)



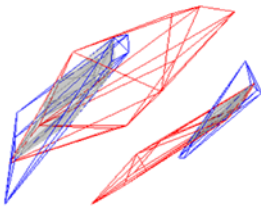
Bird V-type  
without OD  
0.008



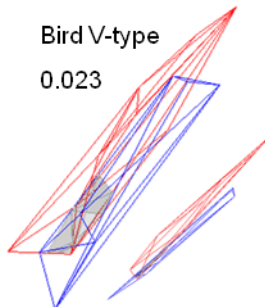
Bird UV-type  
without OD  
0.081



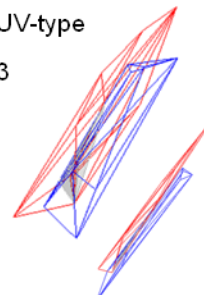
Butterfly  
0.140



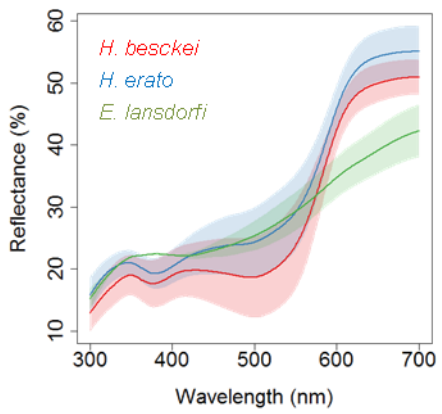
Bird V-type  
0.023



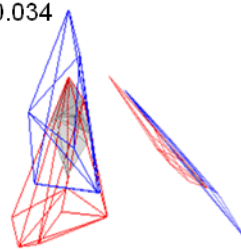
Bird UV-type  
0.013



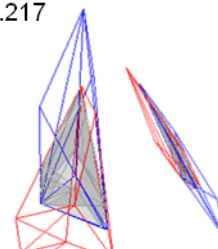
### Ventral Red ("besckei" pattern)



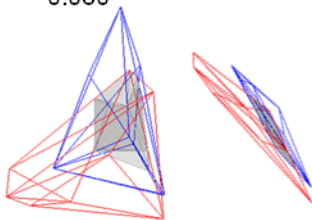
Bird V-type  
without OD  
0.034



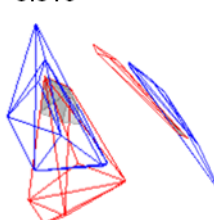
Bird UV-type  
without OD  
0.217



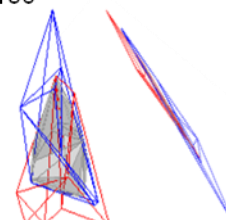
Butterfly  
0.080



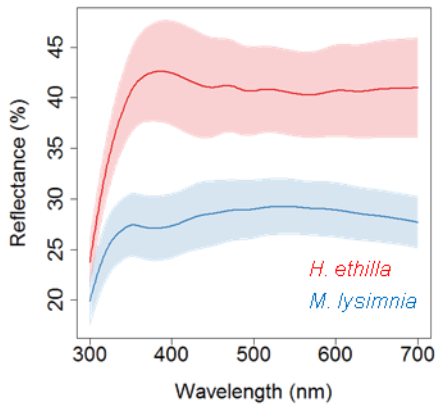
Bird V-type  
0.019



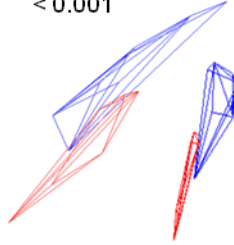
Bird UV-type  
0.156



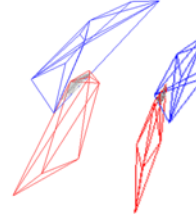
### Dorsal White ("ethilla" pattern)



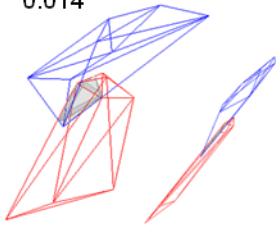
Bird V-type  
without OD  
< 0.001



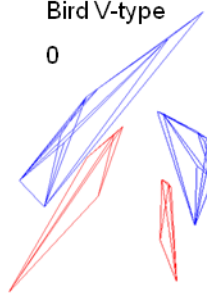
Bird UV-type  
without OD  
0.006



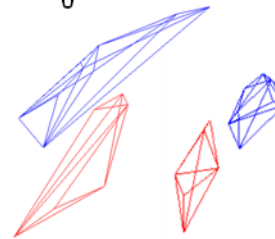
Butterfly  
0.014



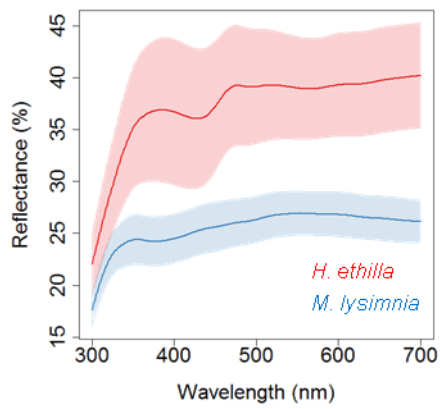
Bird V-type  
0



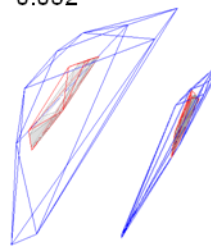
Bird UV-type  
0



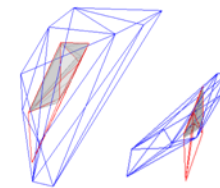
### Ventral White ("ethilla" pattern)



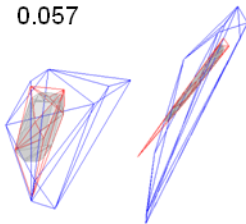
Bird V-type  
without OD  
0.052



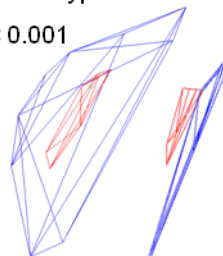
Bird UV-type  
without OD  
0.042



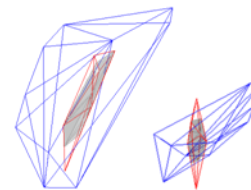
Butterfly  
0.057



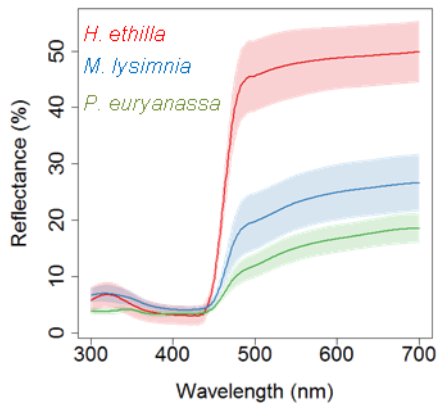
Bird V-type  
< 0.001



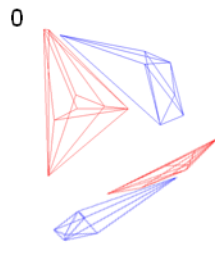
Bird UV-type  
0.057



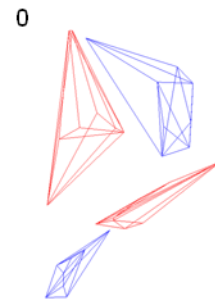
### Dorsal Yellow ("ethilla" pattern)



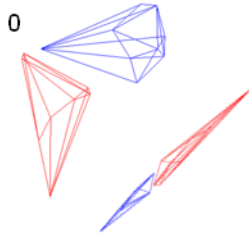
Bird V-type without OD



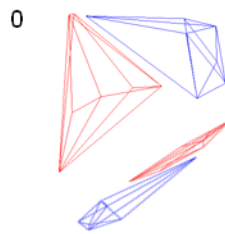
Bird UV-type without OD



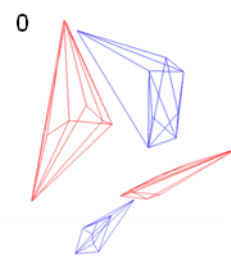
Butterfly



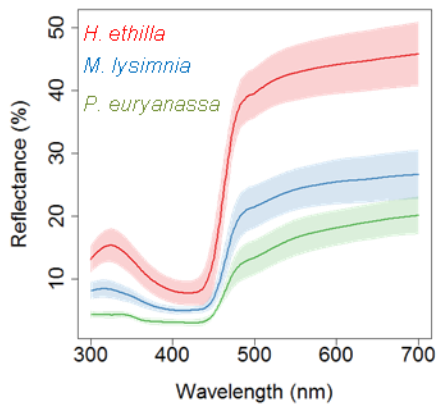
Bird V-type



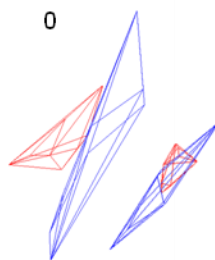
Bird UV-type



### Ventral Yellow ("ethilla" pattern)



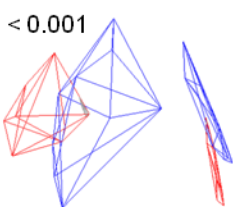
Bird V-type without OD



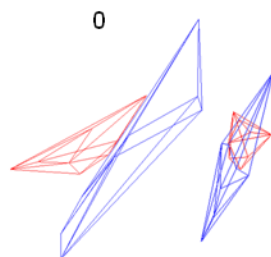
Bird UV-type without OD



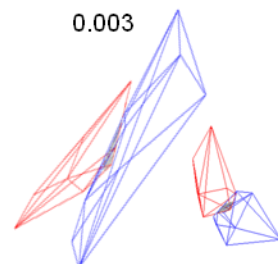
Butterfly



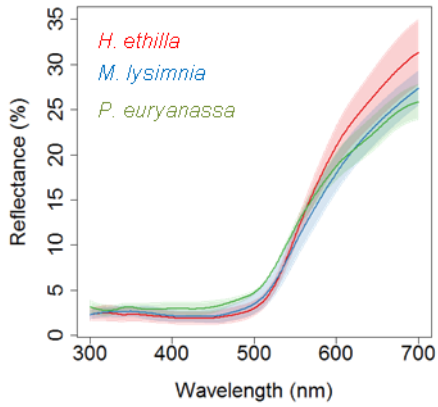
Bird V-type



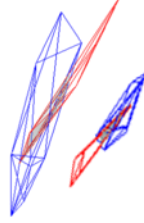
Bird UV-type



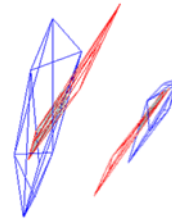
### Dorsal Orange ("ethilla" pattern)



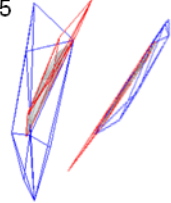
Bird V-type  
without OD  
0.037



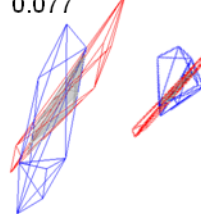
Bird UV-type  
without OD  
0.033



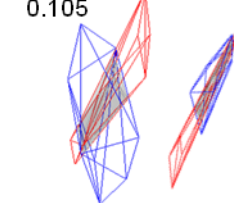
Butterfly  
0.045



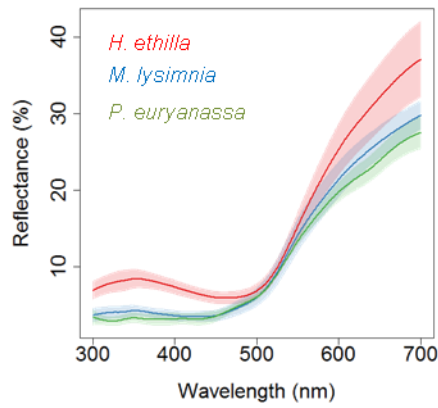
Bird V-type  
0.077



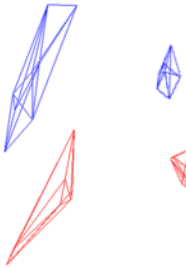
Bird UV-type  
0.105



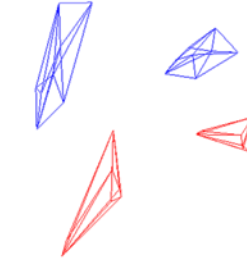
### Ventral Orange ("ethilla" pattern)



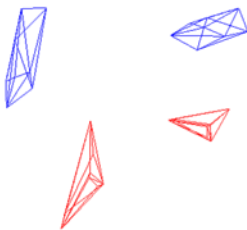
Bird V-type  
without OD  
0



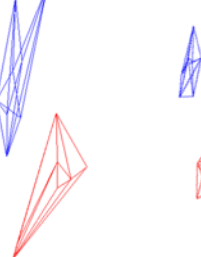
Bird UV-type  
without OD  
0



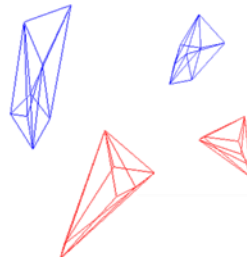
Butterfly  
0



Bird V-type  
0

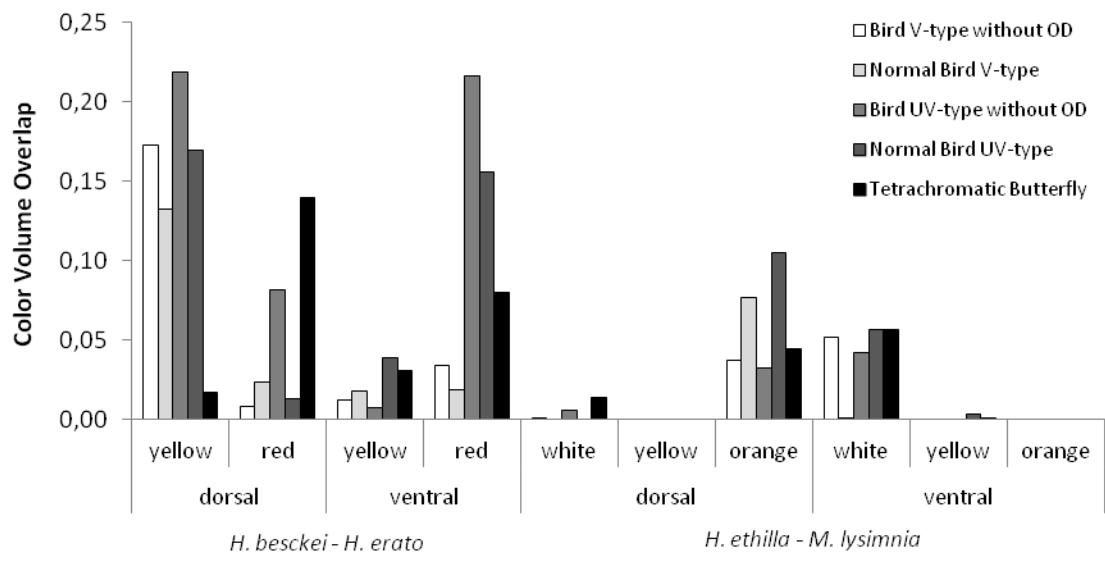


Bird UV-type  
0

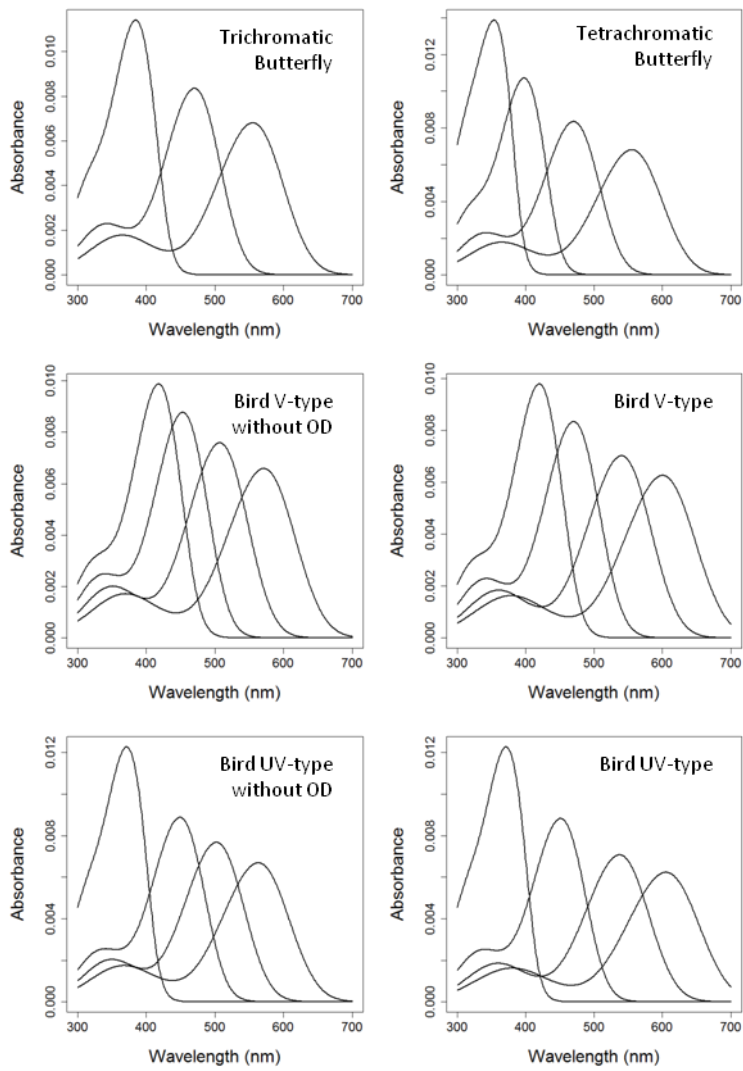


**Figure 3** Spectral reflectance curves from wing patches and color volume overlap between species in the chromaticity diagrams (perceptual spaces) of different viewers. Reflectance curves are plotted for the mean value (line) and standard deviation (shaded area). Each color volume pair is shown graphically in two different angles and numerically for the proportion of overlap. Only the two species of each color pattern with the bigger sample sizes (red and blue curves) were included in the analysis of volume overlap.





**Figure 4** Summary of *color volume overlaps* between analogous colors of two mimetic species in the two color patterns analyzed, according to different visual models. Detailed data are presented in figure 3.



**Figure S1** Spectral sensibility of the visual models analyzed. Peak absorbance data from Bybe et al. (2012) and Hart & Vorobyev (2005). Curve estimates were calculated and plotted in *pavo* (R package) (Maia et al. 2013).

**ARTIGO 2:**

*Eficácia da coloração como sinal mediador do reconhecimento específico em três pares de borboletas miméticas do Sul do Brasil.*

*Effectiveness of coloration as mediator signal of species recognition in three pairs of mimetic butterflies from Southern Brazil.*

André Luis Klein e Aldo Mellender de Araújo

Artigo em preparação a ser submetido para a revista *Behavioral Ecology and Sociobiology*

**Effectiveness of coloration as mediator signal of species recognition in three pairs of mimetic butterflies from Southern Brazil.**

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

Interações competitivas entre espécies podem ocorrer através da exploração em comum por recursos alimentares ou espaço, por exemplo, ou através da utilização de sinais de comunicação sobrepostos. Este último caso pode ocorrer em borboletas quando a coloração mimética também é usada na sinalização sexual, gerando desperdício de tempo e energia com interações equivocadas entre espécies. Em *Heliconius*, têm sido sugerido que a existência de diferenças crípticas na coloração, visíveis pelas borboletas, mas não por predadores, atuam como canal privado de comunicação no reconhecimento específico. Para verificar esta hipótese, avaliamos a capacidade dos machos de três espécies de *Heliconius* do Sul do Brasil em discriminar visualmente entre coespecíficos e co-mímicos. Além disso, também verificamos o grau de discriminação visual entre duas espécies não miméticas potencialmente hibridizáveis. Através de testes em viveiros com modelos isentos de sinais químicos demonstramos a inexistência de reconhecimento entre *H. ethilla* e *Mechanitis lysimnia* pela primeira espécie, contrariando a hipótese da literatura, assim como entre *H. erato* e *H. besckei* por ambas as espécies. Neste segundo caso, houve atração maior pelo modelo heteroespecífico quando os machos eram de *H. besckei*, possivelmente através da atuação de um estímulo supernormal. Além disso, houve um grau intermediário de atração heteroespecífica entre *H. besckei* e *H. ethilla*, muito maior pelos machos da segunda espécie, indicando uma assimetria no isolamento reprodutivo etológico. Tais resultados sugerem que a interferência reprodutiva decorrente do mimetismo só pode ser amenizada por mecanismos alternativos à coloração, como sinais químicos ou segregação de habitat.

Palavras-chave: Reconhecimento de parceiros, Isolamento reprodutivo, Interferência reprodutiva, Mimetismo, *Heliconius*.

## INTRODUÇÃO

A competição entre espécies pode limitar suas distribuições geográficas e/ou seus nichos ecológicos (Krebs 2009). Geralmente a competição interespecífica se configura pela exploração de recursos em comum, como alimento, áreas de forrageio ou repouso, abrigo, ou simplesmente espaço, sendo este fenômeno, portanto, mais comum em zonas de contato secundário entre espécies que divergiram recentemente. Isto se deve em parte ao fato de que para ocorrer especiação basta que o fluxo gênico entre as populações seja interrompido, do que decorre o acúmulo de diferenças em apenas alguns traços e a criação de alguns tipos de barreiras reprodutivas. Portanto, da mesma forma que os nichos ecológicos se mantêm parcialmente sobrepostos, também sinais de comunicação intraespecífica podem permanecer iguais. A interferência reprodutiva ocorre quando alguma similaridade fenotípica ocasiona a interação sexual entre espécies diferentes (Walker 1974; Gröning e Hochkirch 2008), resultando em desperdício de tempo e energia com abordagens, perseguições e cortejos equivocados. Assim, da mesma forma que a competição entre espécies pode gerar deslocamento de caracteres ecológicos, a interferência reprodutiva pode gerar deslocamento de caracteres reprodutivos (Pffennig & Pffennig 2009) – a divergência de sinais de reconhecimento de parceiros e consequente aumento do isolamento reprodutivo entre duas espécies estreitamente relacionadas quando em simpatria, comparativamente ao verificado em alopatria. Há pelo menos um caso em particular, contudo, em que a interferência reprodutiva não é decorrente de uma divergência recente, mas sim da convergência evolutiva de sinais de comunicação. No mimetismo Mülleriano, espécies que portam algum tipo de defesa antipredatória, geralmente química, são beneficiadas pelo compartilhamento de um mesmo sinal de advertência, pois o custo pago pelo aprendizado dos predadores é dividido entre elas

(Müller 1879). No mimetismo Batesiano, uma espécie a priori não protegida converge para o sinal de advertência de uma espécie modelo protegida, parasitando assim um sinal cujo aprendizado por predadores é prejudicado com o aumento da abundância do mímico (Bates 1862). Em borboletas, ao mesmo tempo em que o mimetismo é amplamente difundido dentro de alguns grupos, também a localização, atração e etapas iniciais do cortejo são mediados por sinais visuais. Existe, portanto, um conflito em potencial entre estas duas funções – indivíduos 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 ecológicos (Silberglied 1984; Vane-Wright e Boppré 1993).

No gênero de borboletas neotropicais *Heliconius* há evidências de preferência dos machos por indivíduos com o padrão de coloração coespecífico, indicando que parte do isolamento reprodutivo etológico nestas espécies se dá pelo mesmo sinal envolvido no mimetismo (McMillan et al. 1997; Jiggins et al. 2001, 2004; Muñoz et al. 2010; Merrill et al. 2011, 2014). Já foi demonstrada também a existência de interferência reprodutiva por confusão de sinais visuais entre *H. erato* e *H. melpomene*, onde os machos de cada subespécie de um par mimético gastam um tempo considerável abordando e cortejando modelos feitos com asas de seus co-mímicos (Estrada e Jiggins 2008). Por fim, análises espectrofotométricas com base sensorial revelaram que o pigmento 3OH-quinurenina que produz o amarelo nas asas de *Heliconius* emite luz na faixa UV que seria detectável apenas pelo sistema visual tetracromático destas borboletas, funcionando assim como sinal críptico (para predadores) de discriminação entre coespecíficos e mímicos de outros gêneros que utilizam amarelos sem emissão UV (Briscoe et al. 2010; Bybee et al. 2012; Llaurens et al. 2014). Até o momento, contudo, nenhum teste comportamental foi feito para se verificar a eficácia

destas diferenças crípticas na coloração para a discriminação entre espécies de *Heliconius* e co-mímicos de outros gêneros. Além disso, não há estudos tratando de qualquer uso do padrão de coloração na comunicação intraespecífica em populações e subespécies de *Heliconius* do Sul do Brasil; local onde predomina a Mata Atlântica, enquanto que o centro de diversidade (e pesquisas) do gênero é a região da Floresta Amazônica.

A borboleta *Heliconius besckei* Menetriés ocorre nas regiões Sul, Sudeste e, com apenas um registro (Cardoso 2005), Nordeste do Brasil, em localidades com altitude acima de 700 m, o que torna suas populações relativamente raras, pelo menos comparativamente com a espécie co-mimética *H. erato phyllis* Fabricius, que pode ser encontrada em abundância desde o Sul até o Nordeste e do Centro-Oeste até a costa litorânea do Brasil (Brown 1979). A única diferença óbvia entre os padrões de coloração destas espécies é a existência de uma linha vermelha marginal na face ventral das asas posteriores em *H. besckei*. Ecologicamente, contudo, elas se diferenciam em pelo menos dois traços importantes: as plantas hospedeiras (*Plassiflora* spp.) utilizadas por cada uma e o comportamento de 'cruzamento pupal' – característica de origem única no gênero difundida no clado onde se situa *H. erato* (Gilbert 1976; Deinert et al. 1994; Deinert 2003; Beltrán et al. 2007). Além de *H. besckei*, também se encontra fora deste clado *H. ethilla* Godart, cuja subespécie *narcaea* ocorre no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país e situa-se em um ramo irmão ao de *H. besckei*. Suspeita-se que 6 espécimes capturados no Sul e Sudeste do Brasil e armazenados em coleções sejam híbridos entre elas (Mallet et al. 2007), dado o padrão de coloração misto das asas. As borboletas *Heliconius* são conhecidos exemplos de mimetismo Müllleriano intragenérico e também intergenérico. Na subfamília de Nymphalidae Danainae, na tribo Ithomiini, ocorrem diversos co-mímicos müllerianos de *Heliconius*. Este grupo adquire defesa química através da ingestão de alcalóides



pirrolizidínicos de solanáceas, suas plantas hospedeiras (Freitas et al. 1996; Schulz et al. 2004). *Mechanitis lysimnia* Fabricius é co-mímica de *H. ethilla narcaea*, tendo como diferenças mais visíveis (à visão humana) a forma e tamanho das asas – não chegando a 6 cm de envergadura na primeira e variando entre 7 e 9 cm na segunda. São comuns na região Sul do Brasil áreas de simpatria entre as quatro espécies acima descritas – configuração esta limitada principalmente pela escassez de *H. besckei*.

Neste estudo, avaliamos a eficácia do padrão de coloração das asas como sinal de reconhecimento específico, e assim a possibilidade de interferência reprodutiva, em três pares formados pelas 4 espécies acima – um par mimético intragenérico, um par mimético intergenérico e o par não mimético entre *H. besckei* e *H. ethilla narcaea* (Figura 1). A ausência de discriminação nos pares miméticos pode ser interpretada como um custo da evolução do mimetismo – a interferência reprodutiva – enquanto que qualquer grau de discriminação implica na utilização de canais de comunicação visual privados pelas borboletas (diferenças crípticas para os predadores). A análise no par não-mimético tem como objetivo verificar se é viável pensar em uma baixa eficiência no reconhecimento visual de parceiros por uma ou ambas as espécies como falha no isolamento reprodutivo e possivelmente hibridação, bem como em que sentido se dá esta assimetria, caso exista.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Proveniência dos indivíduos*

Os indivíduos de *Heliconius erato phyllis* e *H. ethilla narcaea* utilizados nos testes foram capturados em populações naturais nos arredores das cidades de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, e os de *H. besckei* nos arredores de São Francisco de Paula, Rio Grande do

Sul, Paula Freitas, no Paraná, e Campo Alegre, em Santa Catarina. Levados para insetários em condições semi-naturais, machos e fêmeas foram mantidos em viveiros separados. Os ovos depositados sobre plantas hospedeiras (*Passiflora* spp.) foram coletados e os imaturos criados em laboratório sob condições controladas de luminosidade e temperatura. Fêmeas adultas eram congeladas logo após a eclosão para a extração das asas. As asas de *Mechanitis lysimnia* resultaram de um indivíduo criado em laboratório cujo ovo foi coletado sobre uma planta hospedeira (*Solanum* sp.) nos arredores de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul.

#### *Montagem dos modelos*

A montagem dos modelos foi baseada em Jiggins et al. (2001) e Jiggins (comunicação pessoal). Asas intactas extraídas de fêmeas foram imersas em hexano por uma hora para se garantir que nenhum composto volátil permanecesse na sua estrutura. Em seguida, elas eram coladas pela sua base em um pedaço de papel cartão de 8x4 mm e unidas por uma tira estreita de fita adesiva, mantendo um espaço de 8 mm entre o lado direito e o esquerdo. No centro desta fita, onde ficaria o corpo da borboleta, era colado um canudo de suco de 25 mm de comprimento. Todas as peças artificiais eram pintadas de preto com marcador permanente para retroprojeter. Após a utilização em 10 testes, novos modelos eram construídos para se evitar efeitos de desgaste. Para o experimento com o par *Heliconius ethilla narcaea*-*Mechanitis lysimnia*, excepcionalmente, foi utilizado um indivíduo bem menor do que a média para a primeira espécie para se evitar ao máximo o efeito da diferença de tamanho nos testes de discriminação. A envergadura de *M. lysimnia* raramente passa de 5 cm, enquanto que a de *H. ethilla* costuma variar entre 6 e 7 cm. O modelo de *H. ethilla* utilizado neste experimento foi construído com um indivíduo de aproximadamente 5,5 cm de envergadura.

## *Experimentos*

Os experimentos foram executados em um dos viveiros de criação onde foi instalada uma estrutura modificada de Jiggins et al. (2001). Nesta estrutura, eram fixados dois modelos distanciados em 1 m e a uma altura de aproximadamente 1 m do solo. Ao redor de cada modelo ficava demarcada uma área esférica de 50 cm de diâmetro com duas circunferências de arame posicionadas ortogonalmente. O movimento da estrutura pelo observador através de um barbante fazia com que ambos os modelos movessem suas asas de forma semelhante a borboletas em vôo, simultaneamente. Os testes foram feitos em um viveiro contendo 4 machos da mesma espécie, no qual, durante 20 minutos, foram registrados em uma planilha dois tipos de interação com os modelos: *aproximação* – toda vez que um macho entrava na área demarcada; e *inspeção* – um vôo sustentado direcionado para o modelo, que caracteriza o início da corte nesta espécie (Klein & Araújo 2010). Em cada teste, os machos foram apresentados a dois modelos simultaneamente – um coespecífico e um heteroespecífico – cujas posições eram alternadas. Cada grupo de 4 machos foi utilizado em 4 testes. O ambiente circundante dos modelos era composto de vegetação mista, provendo um fundo visual (*background*) semelhante ao dos locais onde os indivíduos se encontram naturalmente. Além disso, os experimentos foram realizados sempre no período entre 10:00h e 15:30h – o horário de maior atividade destas borboletas – em dias com temperatura mínima de 20°C e sem vento forte.

Foram realizados os seguintes tratamentos: 1) *Heliconius erato* e *H. besckei* apresentados a machos de *H. erato*; 2) *H. erato* e *H. besckei* apresentados a machos de *H. besckei*; 3) *H. besckei* e *H. ethilla* apresentados a machos de *H. besckei*; 4) *H. besckei* e *H. ethilla* apresentados a machos de *H. ethilla*; 5) *H. ethilla* e *Mechanitis lysimnia* apresentados a machos de *H. ethilla*.

## RESULTADOS

Foram considerados válidas as observações em que houve pelo menos uma interação do tipo *inspeção*, resultando em um total de 20 testes (400min de observação) nos experimentos de 1 a 4 e de 10 testes (200min de observação) no experimento 5. As frequências relativas de interações aos modelos heteroespecíficos e coespecífico de cada teste estão representadas na figura 2, acompanhadas da significância estatística da diferença pelo teste de Wilcoxon. Um sumário com as médias ( $\pm$ DP) dos números absolutos de interações pode ser visto na tabela 1.

Os machos de *Heliconius erato* não demonstraram discriminação entre os modelos, tendo, contudo, executado os maiores números totais de aproximações e principalmente inspeções aos modelos dentre as três espécies testadas. Apesar de realizar cruzamento pupal, em que a via principal de comunicação é provavelmente química (Deinert 2003), ou no mínimo não é mediada pela coloração das asas, os machos de *H. erato phyllis* parecem ser mais atraídos por este tipo de sinal do que as duas espécies que não executam esta estratégia de acasalamento. Outra possibilidade é que *H. erato phyllis* tenha maior capacidade de aclimatação às condições semi-naturais em que os experimentos foram realizados, se mostrando assim mais ativa de um modo geral. Esta alternativa se torna especialmente válida na comparação com *H. besckei*, pois esta é típica de ambientes mais frios, com altitude acima dos 700m, enquanto que os experimentos foram realizados em uma altitude de apenas 10-20m acima do nível do mar. Os machos de *H. besckei* surpreendentemente apresentaram preferência pelos modelos heteroespecíficos, executando maior número de aproximações ( $p = 0,024$ ) e inspeções ( $p = 0,005$ ) ao modelo de *H. erato*. Esta diferença, contudo, apesar de consistente não foi muito grande, como pode ser visto na figura 2A e na tabela 1. Quando o modelo heteroespecífico era de *H. ethilla*, contudo, os machos de *H.*

*besckei* inspecionaram significativamente mais os modelos de sua própria espécie (Figura 2B e Tabela 1). Neste caso, a natureza não paramétrica do teste utilizado camufla a amplitude da diferença, melhor representada pela análise dos valores absolutos: apenas em 4 dos 20 testes deste experimento os machos executaram a interação tipo ‘inspeção’ ao modelo de *H. ethilla*, tendo ocorrido 1 evento em 3 testes e 5 eventos no outro, totalizando 8 inspeções ao modelo heteroespecífico, contra 489 ao coespecífico (1,6%). Neste mesmo tratamento, as aproximações não diferiram entre os modelos e ocorreram com baixa frequência, significando que na maioria das vezes em que os machos se aproximavam do modelo era para executar a inspeção. Quando este par de espécies foi apresentado a machos de *H. ethilla* ocorreu o mesmo padrão: sem diferença para aproximações e com maior número de inspeções ao modelo coespecífico. Aqui novamente a informação mais instigante é revelada pela análise “fina” a partir dos números absolutos: ocorreram inspeções heteroespecíficas em 16 dos 20 testes realizados, totalizando 57 interações deste tipo ao modelo de *H. besckei*, contra 284 ao modelo coespecífico. Ou seja, 20% das inspeções realizadas pelos machos de *H. ethilla* foram feitas sobre o modelo de uma espécie não mimética; cerca de 10 vezes mais do que a proporção resultante das inspeções heteroespecíficas feitas por *H. besckei*. No último experimento realizado, também com machos de *H. ethilla*, não houve indicação de preferência entre os modelos. Apesar do tamanho amostral aqui ter sido menor, os valores obtidos não sugerem sequer uma tendência para o reconhecimento correto de parceiros, tendo havido inclusive um número um pouco maior de interações com o modelo heteroespecífico (Figura 2C e Tabela 1).

## DISCUSSÃO

A execução de aproximações e inspeções a modelos isentos de sinais químicos pelos machos indica que os sinais visuais são suficientes para disparar o início do cortejo nas três espécies de *Heliconius* testadas. Esta mesma informação corrobora o padrão demonstrado até então apenas para espécies amazônicas do gênero de que o reconhecimento específico é mediado (pelo menos parcialmente) pelo padrão de coloração mimético das asas. No caso de mimetismo intragenérico analisado foi marcante o grau de interferência reprodutiva ocasionada pela convergência de sinais, uma vez que os machos de *H. besckei* demonstraram inclusive preferência pelo seu co-mímico. A interpretação deste resultado está longe de ser óbvia. A única diferença evidente na coloração entre estas espécies é a linha vermelha marginal na face ventral das asas posteriores, que não são, portanto, expostas nas condições do experimento. Dados de outro estudo recente em andamento, contudo, revelaram que diferenças sutis no amarelo são passíveis de discriminação pelo sistema visual tetracromático de *Heliconius*, mas não por aves, principalmente para aquelas portadoras do sistema visual tipo-V. Acredita-se que o amarelo das asas de *Heliconius*, seja utilizado para discriminar co-mímicos de outros gêneros, sendo possível, portanto, que haja uma preferência errônea pelo amarelo heteroespecífico em pares miméticos intragenéricos. Consideramos mais provável, contudo, que o vermelho seja o principal sinal responsável pela interferência reprodutiva neste par mimético. Apesar de se apresentar como a cor mais similar entre estas espécies, com diferenças indiscrimináveis mesmo pela visão das próprias borboletas (estudo em andamento), a distribuição desta cor nas asas das fêmeas se dá sobre uma área maior em *H. erato* do que em *H. besckei* (Klein & Araújo 2013). O vermelho é um importante sinal disparador do cortejo em *H. erato* (Crane 1955; Finkbeiner 2014). A mancha maior de *H. erato phyllis*, assim, pode atuar como um ‘estímulo

supernormal' (Tinbergen 1951) para *H. besckei*, supondo que esta cor tenha efeitos semelhantes para ambas as espécies. Em *Heliconius*, o mimetismo intragenérico é freqüentemente encontrado entre espécies de clados diferentes, normalmente envolvendo uma com cruzamento pupal e outra sem (Gilbert 1991). No cruzamento pupal a comunicação química deve ter evoluído de modo particular e se tornado fundamental na localização de fêmeas pelos machos (Deinert 2003; Estrada et al. 2010). Assim, a interferência reprodutiva entre *H. besckei* e *H. erato phyllis*, já observada em cativeiro na forma de perseguições interespecíficas (Emsley 1970 e observações pessoais), pode ser amenizada por sinais químicos reconhecidos principalmente pela segunda espécie.

Mesmo tendo ocorrido reconhecimento visual de parceiros pelos machos de ambas as espécies no par não mimético analisado – *Heliconius besckei* e *H. ethilla* – houve um pequeno grau de atração heteroespecífica pela primeira espécie e um nível mais considerável, de aproximadamente 12 vezes maior, pela segunda espécie. Este padrão implica, em primeiro lugar, em uma assimetria no isolamento reprodutivo entre estas espécies próximas filogeneticamente. Na natureza, os machos de *H. ethilla* devem fazer uso de sinais químicos ou comportamentais para evitar os custos da interferência reprodutiva com *H. besckei*. É possível ainda que haja algum tipo de segregação espacial no ambiente que reduza a taxa de encontros entre estas espécies.

Nossos testes de discriminação entre *Heliconius ethilla* e *Mechanitis lysimnia* não são coerentes com a ideia de que diferenças crípticas nas cores, mais especificamente no amarelo, sejam utilizadas como canal de comunicação privado para o reconhecimento específico por machos da primeira espécie (Briscoe et al. 2010; Bybee et al. 2012; Llaurens et al. 2014). Este foi o primeiro teste comportamental realizado para verificar esta hipótese. Deve-se levar em conta que foi utilizado um tamanho menor do que a média para o modelo

de *H. ethilla* como forma de se evitar o efeito do tamanho na discriminação. É possível que o suposto sinal críptico seja percebido forma eficiente apenas em indivíduos maiores. Se isto for verdade, ainda assim é preciso se reconhecer a baixa eficiência das diferenças espectrais do amarelo como mecanismo de reconhecimento isoladamente. Provavelmente as cores, o tamanho e a forma das asas se reforcem mutuamente como sinais de reconhecimento específico para *H. ethilla*. Diferenças comportamentais, como tipo e altura de voo, também podem ser importantes componentes de um sistema multimodal de comunicação que em sinergia reduzam substancialmente o grau de interferência reprodutiva entre estas espécies.

O cortejo equivocado entre espécies devido à sua similaridade fenotípica, denominado interferência reprodutiva, é um fenômeno comum em animais (Gröning & Hochkirch 2008) e é proposto 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). Este tipo de interação, contudo, permanece pouco explorado entre espécies miméticas, sabendo-se ainda menos sobre os seus efeitos sobre características comportamentais e ecológicas.

Nossos experimentos demonstraram a insuficiência de possíveis diferenças nas cores como mecanismo de isolamento reprodutivo para os machos de três espécies de *Heliconius*. Este padrão fornece um bom sustento para a possibilidade da interferência reprodutiva representar um custo da evolução do mimetismo, bem como um custo da coexistência entre espécies miméticas. Custo este que se daria na forma do desperdício de tempo e energia decorrentes da aproximação, perseguição e inspeção pelos machos, o que por fim resultaria em menor tempo e energia gastos com alimentação, localização e cortejo de fêmeas coespecíficas, no caso dos machos, e oviposição, no caso das fêmeas. Dada a



ineficácia de sinais baseados nas cores e forma das asas, deve-se agora procurar outros mecanismos que amenizem a interferência reprodutiva decorrente da convergência mimética. 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; Rutowski 1984). Assim, consideramos frutífero se investir na procura não apenas de mecanismos de reconhecimento, isto é, comunicativos, mas também em formas de 'evitamento' de encontros. A segregação espacial em pequena escala, horizontal ou vertical, sem desconfigurar a simpatria em maior escala, pode reduzir ou mesmo evitar encontros heteroespecíficos entre co-mímicos. Da mesma forma, a partição temporal dos picos de atividade amenizaria esta forma de competição decorrente do compartilhamento de um sinal de comunicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Somos gratos aos integrantes do Laboratório de Genética Ecológica que colaboraram com as capturas e a criação de borboletas e lagartas durante este estudo (Ana Carolina Bahi Aymone, Ana Carolina Silva, Etiele Senna Luciana Silva, Bruna Missagia, Janaína De Nardin, Marcelo Costa e Pietro Pollo). Agradecemos também a Chris Jiggins pelas instruções detalhadas sobre a construção dos modelos experimentais. Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida a um dos autores (ALK).

## REFERÊNCIAS

Bates HW (1862) Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley: Lepidoptera: Heliconidae. Transactions of the Linnean Society of London 25 (1862) 495-566.

Beltran M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E, Mallet J (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. Soc. 92: 221–239.

Briscoe AD, Bybee SM, Bernard GD, Yuan F, Sison-Mangus MP, Reed RD, Warren AD, Llorente-Bousquets J, Chiao C (2010). Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:3628–3633.

Brower LP, Brower JVZ, Collins CT (1963) Experimental studies of mimicry. 7. Relative palatability and Mullerian mimicry among Neotropical butterflies of the subfamily Heliconiinae. Zoologica 48: 65–84.

Brown KS (1979) Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotropicais. Unicamp, Campinas. Monografia 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. Am. Nat. 179:38–51.

Cardoso MZ (2005). New localities for *Heliconius besckei* Ménétriés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. Neotropical Entomology 34(6): 1007-1008.

Deinert EI (2003) Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (eds) Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight. University of Chicago Press, Chicago, pp. 91-108.

Deinert EI, Longino JT, Gilbert LE (1994). Mate competition in butterflies. Nature 370: 23–24.

- Emsley MG (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 LE (2010) Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. *Proc Biol Sci.* 277(1680): 407–413.
- 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? *J. Evol. Biol.* 21: 749-760.
- Freitas AVL, Trigo JR, Brown KS, Witte L, Hartmann T, Barata LES (1996) Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology* 7: 61-67.
- Gilbert LE (1991) Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process and problems. In: Price P. W., Lewinsohn T. N., Fernandes T. W. and Benson W. W. (eds) *Plant-animal interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 403-427.
- Gilbert LE (1976) Postmating female odor in *Heliconius* Butterflies - male-contributed anti-aphrodisiac. *Science* 193: 419–420.
- Gröning J, 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.
- Jiggins CD, Estrada C, Rodrigues A (2004) Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconius melpomene* Linnaeus. *J. Evol. Biol.* 17: 680-691.
- 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: 409-420.

- Klein AL, Araújo AM (2013). Sexual size dimorphism in the color pattern elements of two mimetic *Heliconius* butterflies. *Neotropical entomology*, 42(6), 600-606.
- Krebs CJ (2009) *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 6<sup>th</sup> ed. Benjamin Cummings. 688p
- Llaurens V, Joron M, Thery M (2014) Cryptic differences in colour among Mullerian mimics: how can the visual capacities of predators and prey shape the evolution of wing colours. *J. Evol. Biol.* 27: 531–540.
- Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W & Linares M (2007) Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology* 7(28).
- McMillan WO, Jiggins CD, Mallet J (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8628-8633.
- Merrill RM, Gompert Z, Dembeck LM, Kronforst M, McMillan WO, Jiggins CD (2011). Mate preference across the speciation continuum in a clade of mimetic butterflies. *Evolution* 65(5): 1489-1500.
- Merrill RM, Chia A, Nadeau NJ (2014) Divergent warning patterns contribute to assortative mating between incipient *Heliconius* species. *Ecology and evolution*, 4(7), 911-917.
- Müller F (1879) *Ituna* and *Thyridia*: a remarkable case of mimicry in butterflies. *Trans. Entomol. Soc. Lond* 1879:xx–xxix.
- Muñoz AG, Salazar C, Castaño J, Jiggins CD, Linares M (2010) Multiple sources of reproductive isolation in a bimodal butterfly hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1312-1320.
- Pfennig KS, Pfennig DW (2009) Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem. *The Quarterly Review of Biology*, 84(3), 253.

Rutowski RL (1984) Sexual selection and the evolution of butterfly mating behavior. *J. Res. Lepid.* 23: 125-142.

Schulz S, Beccaloni G, Brown KS, Boppré M, Freitas AVL, Ockenfels P, Trigo JR (2004) Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochemical systematics and ecology*, 32(8), 699-713.

Scott JA (1973) Mating of butterflies.

Silberglied RE (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.

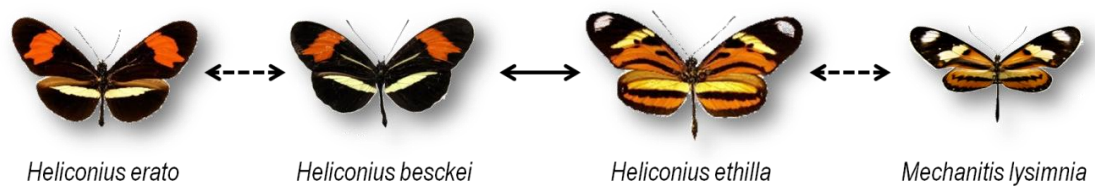
Tinbergen N (1951). *The study of instinct*.

Vane-Wright RI, Boppré M (1993) Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 340: 197-205.

Walker TJ (1974) Character displacement and acoustic insects. *American Zoologist* 14(4):1137–1150.

**Table 1** Approaches (A) and courtships (B) made by males to heterospecific (H) and conspecific (C) female models in 20 min paired experiments. Mean and SD values are presented. Statistically significant differences revealed with Wilcoxon test are in bold.

		<b>A) Approaches</b>			
		Males			
		<i>H. erato</i>	<i>H. besckei</i>	<i>H. ethilla</i>	
Heterospecific model	<i>H. erato</i>	H	-	<b>6.1 (± 5.51)</b>	-
		C	-	<b>3.25 (± 3.56)</b>	-
	<i>H. besckei</i>	H	13.35 (± 9.96)	-	8.3 (± 7.83)
		C	17.55 (± 10.56)	-	10.45 (± 7.84)
	<i>H. ethilla</i>	H	-	3.6 (± 4.39)	-
		C	-	4.4 (± 6.38)	-
	<i>M. lysimnia</i>	H	-	-	11.7 (± 8.49)
		C	-	-	8.2 (± 4.78)
		<b>B) Courtships</b>			
		Males			
		<i>H. erato</i>	<i>H. besckei</i>	<i>H. ethilla</i>	
Heterospecific model	<i>H. erato</i>	H	-	<b>25.35 (± 12.33)</b>	-
		C	-	<b>16.65 (± 9.44)</b>	-
	<i>H. besckei</i>	H	20.3 (± 10.62)	-	<b>2.85 (± 4.09)</b>
		C	22.85 (± 14.11)	-	<b>14.2 (± 7.66)</b>
	<i>H. ethilla</i>	H	-	<b>0.4 (± 1.14)</b>	-
		C	-	<b>24.45 (± 15.49)</b>	-
	<i>M. lysimnia</i>	H	-	-	16.5 (± 10.81)
		C	-	-	12.9 (± 6.00)



**Figure 1** Possibilities of reproductive interference between the studied species due to mimetic convergence (dashed arrows) or phylogenetic proximity (full arrow).

A

Models

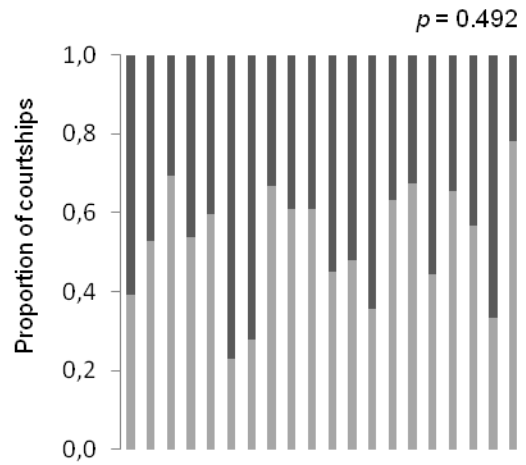
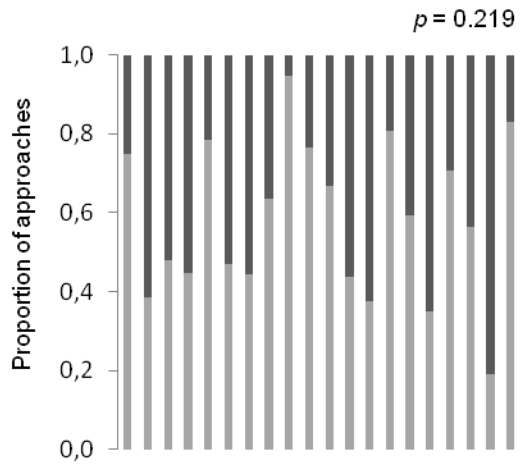


*H. erato*

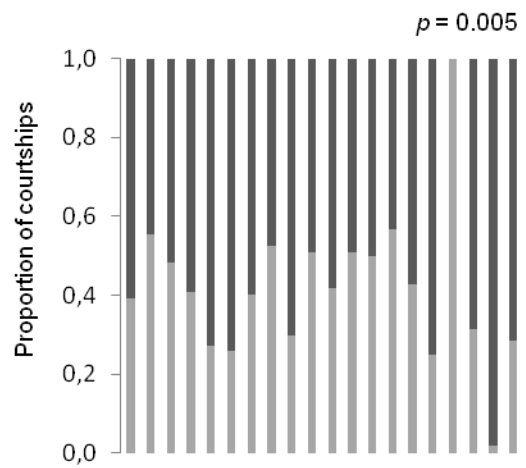
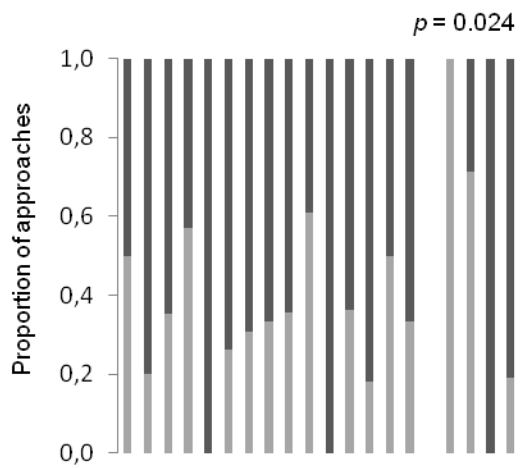


*H. besckei*

*H. erato* males



*H. besckei* males





**B**

**Models**

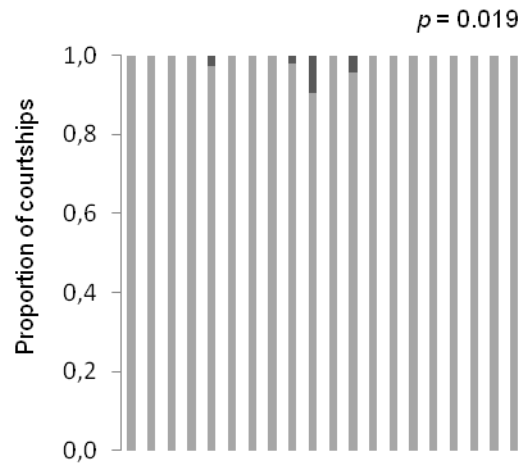
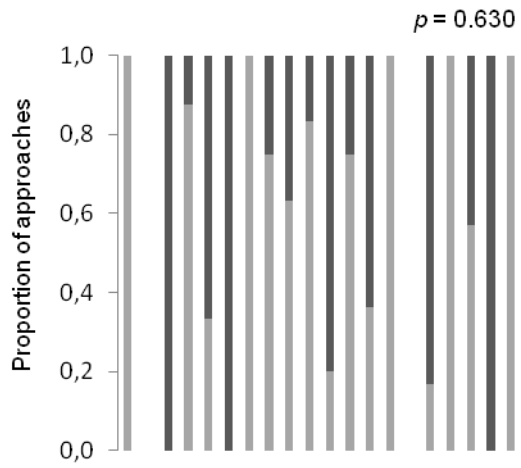


*H. besckei*

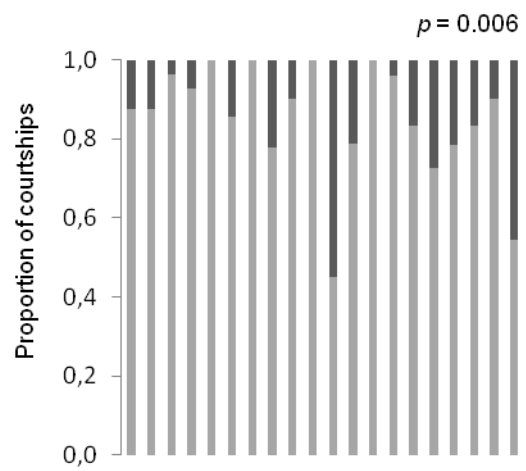
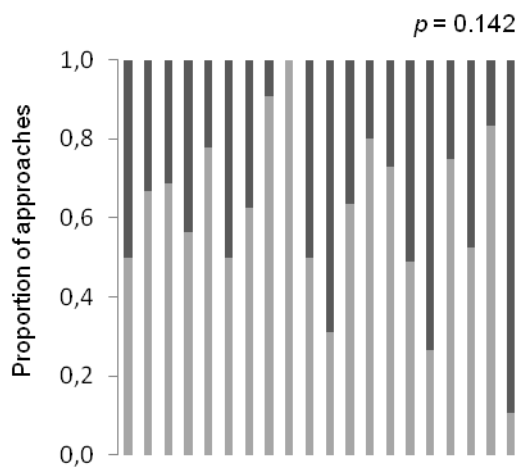


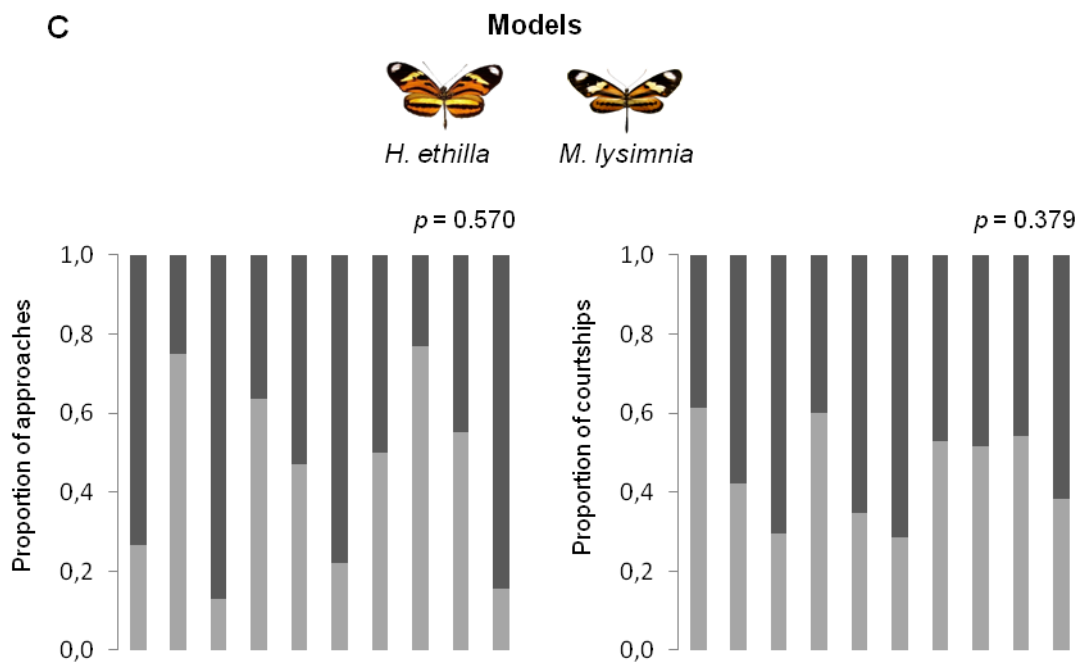
*H. ethilla*

***H. besckei* males**



***H. ethilla* males**





**Figure 2** Proportion of approaches and courtships executed by males to heterospecific (dark gray) and conspecific (light gray) female models. Each column represents an individual experiment of 20 min ( $P$  values according to Wilcoxon test). Absolute number of interactions can be estimated from the mean values in table 1. *Heliconius* pairs (A and B) were tested for males of both species, while the intergeneric pair (C) was tested only for *H. ethilla* males.

**ARTIGO 3:**

*Etologia comparada da corte em três borboletas Heliconius: possíveis relações com mimetismo e comportamento de voo*

*Comparative ethology of courtship in three Heliconius butterflies: possible relations with mimicry and flight behavior*

André Luis Klein e Aldo Mellender de Araújo

Artigo em preparação a ser submetido para a revista *Ethology*

**Comparative ethology of courtship in three *Heliconius* butterflies: possible relations with mimicry and flight behavior.**

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

Interações de corte podem ser analisadas comparativamente entre espécies se seus detalhes forem descritos e quantificados. Apesar da vasta literatura sobre as borboletas *Heliconius*, incluindo como temas principais a diversificação e os mecanismos de isolamento reprodutivo, muito pouco se sabe em termos de comportamentos de corte. A falta de estudos descritivos impossibilita a reconstrução histórica de comportamentos sexuais entre espécies e grupos aparentados. Além disso, o conhecimento de padrões comportamentais de interação macho-fêmea pode complementar a interpretação de estruturas comunicativas específicas, como cores e feromônios, bem como indicar novos alvos de estudos sobre reconhecimento e escolha de parceiros. Dando continuidade a um trabalho anterior com *H. erato phyllis*, caracterizamos aqui o comportamento de corte de *H. ethilla narcaea* e *H. besckei*, comparando o repertório comportamental, a composição e a estrutura da corte entre as três espécies. Duas unidades comportamentais de *H. ethilla* tornam sua corte diferente da de sua espécie próxima, *H. besckei*. Esta, por sua vez, apresenta comportamentos mais semelhantes aos da espécie co-mimética distante filogeneticamente, *H. erato*. A comparação adicional com *Dryas iulia*, pertencente a um grupo basal de heliconíneos, sugere que a corte de *H. ethilla* represente um padrão mais primitivo, do qual *H. besckei* teria divergido. Propomos que esta divergência seja o resultado indireto da convergência comportamental entre as espécies co-miméticas, através das relações diretas entre mimetismo, forma das asas e comportamento de voo. As demais unidades comportamentais e a sequência de eventos também são discutidas, ainda que em outros contextos.

Palavras-chave: Comportamento sexual, Evolução do comportamento, Mimetismo locomotor, Lepidoptera.

## INTRODUÇÃO

No repertório de comportamentos de um animal se encontram movimentos reconhecíveis e, portanto, constantes na forma, que não precisam ser aprendidos e, do mesmo modo que características morfológicas, podem ser caracteres distintivos da espécie. Tais ‘padrões fixos de ação’ constituem-se, assim, em objetos válidos de análise comparada (Eibl-Eibesfeldt 1979). Estudos de etologia comparada, no entanto, vêm perdendo espaço nas últimas décadas para testes mais específicos e experimentais de hipóteses, ora em abordagens fisiológicas, ora no campo da ecologia comportamental. Apesar de terem se revelado uma fonte explosiva de novos conceitos e teorias, em nenhuma destas áreas parece haver espaço para a descrição detalhada de ‘padrões fixos de ação’, antes de tudo, bem como para a análise destas características dentro de uma perspectiva temporal (a sequência de eventos) ou filogenética (comparativa). O presente estudo almeja elucidar o comportamento de corte de duas espécies de borboletas *Heliconius* e iniciar uma análise comparada dentro do gênero, incluindo a exploração de uma hipótese a ser apresentada mais adiante.

As interações de corte em borboletas já atraíam a atenção de Darwin (1871), que procurou estabelecer algumas das primeiras relações entre esta categoria de comportamento, estruturas físicas (as cores das asas) e um processo seletivo (a escolha de parceiros pelas fêmeas). Mais tarde, Tinbergen (1941) descreveu as etapas da corte de *Hyparchia semele* e explorou diversos ‘estímulos desencadeadores de resposta’, alterando a forma, o tamanho e o movimento das fontes de sinal (Tinbergen 1972). Este estudo pioneiro tem sido seguido, mais recentemente, por análises comparadas e a elucidação de mecanismos de isolamento reprodutivo no gênero (Pinzari 2009, Pinzari & Sbordoni 2012). O estudo da corte em borboletas também tem revelado sinais importantes para o isolamento reprodutivo em

pierídeos (Friberg et al. 2008) bem como o significado de posturas das fêmeas em licenídeos (Ide 2011) e pierídeos (Watanabe & Irie 2011).

Apesar de seu destaque como organismo de estudo em biologia evolutiva, no que diz respeito ao comportamento reprodutivo as pesquisas com *Heliconius* têm sido focadas quase exclusivamente na atração de machos por diferentes fenótipos de fêmeas (Merrill et al. 2015). Até o momento, apenas duas subespécies de *H. erato* tiveram seu comportamento de corte descrito em detalhes (Crane 1955, Klein & Araújo 2010). Sabe-se, portanto, muito pouco sobre outros ‘mecanismos desencadeadores de resposta’ além da coloração das asas, bem como sobre como tais respostas podem se manifestar em termos de ‘padrões fixos de ação’. Tratando-se de comunicação em borboletas *Heliconius*, contudo, é impossível não levar em conta o importante contexto do mimetismo em que se inserem estes organismos. Diferentes espécies que ocorrem em simpatria convergiram para um mesmo padrão de coloração, o que pode acarretar uma interferência reprodutiva por confusão de sinais (Estrada & Jiggins 2008). Espera-se, assim, que existam mecanismos compensatórios de reconhecimento entre espécies co-miméticas o que torna ainda mais urgente o conhecimento detalhado de seus comportamentos de corte. Como sequência do estudo iniciado em 2010 por Klein & Araújo, sobre a corte de *H. erato phyllis*, o presente trabalho teve como objetivo principal a descrição da corte de duas espécies que ocorrem em simpatria com aquela no Sul do Brasil: *H. besckei*, que é um co-mímico de *H. erato phyllis*, mas apresenta distribuição limitada a locais com altitude superior a 700m; e *H. ethilla narcaea*, que pertence a outro complexo mimético, mas é muito próxima filogeneticamente de *H. besckei*. Concomitantemente, a partir da análise comparada da corte entre as três espécies, pretende-se explorar a hipótese de que o mimetismo locomotor (Srygley 1994, 1999, 2004, Jones et al. 2013) ou outro fator que possa levar à

convergência morfológica e/ou comportamental entre mímicos tenha gerado como subproduto algum grau de convergência entre os comportamentos de corte de *H. erato phyllis* e *H. besckei*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Até o momento foi possível concluir apenas a análise do comportamento de corte de *Heliconius ethilla narcaea*. As informações referentes à *H. besckei* provêm de cinco observações filmadas, das quais três constituem cortejos bem sucedidos (i.e., terminados em cópula) tratando-se assim de dados ainda preliminares.

### *Origem dos indivíduos*

Todas as fêmeas utilizadas nas observações eram virgens e provenientes de uma criação mantida em laboratório e viveiros. Ovos depositados nos viveiros sobre plantas hospedeiras (*Passiflora edulis* e *P. caerulea*) por fêmeas capturadas na natureza eram levados ao laboratório e mantidos em câmara incubadora sob condições controladas de luminosidade e temperatura. As lagartas eram criadas juntas com outras da mesma espécie, inicialmente em potes plásticos onde eram guardados os ovos com ramos das plantas hospedeiras, sendo transferidos para caixas de vidro maiores quando atingiam o quarto instar, onde permaneciam até formar a pupa e emergir o adulto, que era então marcada e transferida para um viveiro. As fêmeas eram mantidas em viveiros separados dos machos até o momento da observação.



### *Observações e filmagens*

As observações foram feitas em viveiros de aproximadamente 3x3x3m de lado delimitados por tela com 50% de obstrução da luz e contendo plantas de diversas espécies, além de *Passifloras*, criando assim um ambiente semi-natural. A partir do segundo dia após a introdução no viveiro as fêmeas podiam ser utilizadas para as observações, sempre que houvesse condições climáticas favoráveis (temperatura de no mínimo 20°C e céu não completamente coberto), no período entre 10:00h e 15:30. Um macho era retirado de outro viveiro contendo apenas machos e introduzido no viveiro com a fêmea virgem. Normalmente era necessário se esperar alguns minutos para a aclimação até que os indivíduos se encontrassem. Quando o macho mostrava-se inativo por muito tempo a observação era cancelada. Caso contrário, com uma filmadora (Panasonic SDR-H200) em mãos, iniciava-se a gravação sempre que um dos indivíduos levantava voo afim de não se perder o início de uma possível interação. As observações eram feitas até o momento da cópula ou por um tempo máximo de 30 min. Foram realizadas 20 observações com 18 diferentes machos. Apenas um foi utilizado em três observações, das quais apenas uma resultou em cópula. Em 3 observações, excepcionalmente haviam borboletas de outras espécies (*H. erato* e *H. besckei*) e, destas, em duas excepcionalmente haviam cinco fêmeas virgens de *H. ethilla* ao invés de apenas uma. Em outras duas observações, excepcionalmente a fêmea é que foi introduzida em um viveiro contendo vários machos; destas, uma resultou em cópula. Do total das 20 observações filmadas, 15 resultaram em cópula.

### *Análise dos vídeos e quantificação*

Os filmes foram assistidos cuidadosamente quantas vezes fossem necessárias para a descrição de *unidades comportamentais* (padrões de movimento ou postura distinguíveis e recorrentes) das interações macho-fêmea. Com base nas unidades comportamentais (UCs) descritas os filmes foram transcritos, anotando-se os tempos de início e fim de cada evento. As transcrições foram utilizadas como guia remissivo sempre que era preciso se rever unidades comportamentais específicas e para todas as análises quantitativas. Como forma de se homogeneizar a caracterização da corte apenas as 15 observações que resultaram em cópula foram utilizadas nas análises quantitativas. Para caracterizar a corte em termos de *composição* foram calculadas as *proporções de tempo gasto* (tempo de execução/tempo de interação – baseado em Martin & Bateson 1992) para cada UC. Para caracterizar a corte em termos de *estrutura* as transcrições dos filmes foram convertidas em uma matriz de Markov, onde cada linha corresponde ao evento precedente e cada coluna ao evento sucessor. Assim, a partir da razão entre o número de vezes que cada transição ocorreu e o número total de vezes que o evento precedente ocorreu foram obtidas as probabilidades de transições de Markov de primeira ordem, em que a chance de um evento ocorrer depende apenas da ocorrência do evento imediatamente anterior (Fagen & Young 1978). Por fim, estas probabilidades foram organizadas em um fluxograma de eventos.

## **RESULTADOS**

### *Unidades comportamentais*

A identificação e descrição das unidades comportamentais foram baseadas em outro estudo realizado pelos mesmos autores (Klein & Araújo 2010) com *Heliconius erato phyllis*.

Assim, visando facilitar a análise comparativa, comportamentos muito semelhantes com aquela espécie, para as quais não foi possível notar diferenças significativas, foram nomeados igualmente.

Foram descritas nove unidades comportamentais, organizadas por fim em um etograma (tabela 1). Destas, três são executadas exclusivamente (*hovering* e *androconia exposition*) ou principalmente (*slow flapping*) por machos, três exclusivamente por fêmeas (*wings spread*, *fast flapping* e *contraction*) e em três ambos estão simultaneamente envolvidos (*flight interaction*, *flight pursuit* e *spiraling flight*).

#### *Composição e estrutura da corte*

A ocorrência das UCs nas observações de cortejos bem sucedidos e a proporção de tempo gasto (PTG) com cada uma estão representadas na figura 1. A UC *androconia exposition* foi o componente mais importante, tendo ocorrido em todas as observações e ocupado em média 37,5% (DP  $\pm$  16,2%) do tempo de interação. Em segundo lugar está *hovering*, que só não ocorreu em uma das observações e teve PTG médio de 32,5% (DP  $\pm$  18%). O terceiro componente mais importante foi *spiraling flight* com ocorrência em sete das 15 observações e PTG médio de 25,9% (DP  $\pm$  23,5%). Em seguida aparecem *flight interaction* e *flight pursuit*. A categoria *other* inclui comportamentos não quantificados separadamente, principalmente ‘inspeções’ rápidas que o macho faz à fêmea, *slow flapping* e *fast flapping*.

A estrutura da corte (como os componentes se relacionam) foi representada na forma de um fluxograma de transições de eventos (figura 2). As interações que terminaram em cópula podiam ter início de dois modos: um macho encontrava uma fêmea em voo ou a encontrava pousada. Como pode ser visto no fluxograma, no primeiro caso a sequência mais provável começa com *spiraling flight*, então a fêmea pouso e o macho executa o

*hovering*, pousando próximo da fêmea e executando *androconia exposition* imediatamente antes do acoplamento genital. Quando o macho encontra a fêmea já pousada, na sequência mais provável apenas é suprimido o *spiraling flight*, sucedendo-se da mesma forma a partir do *hovering*. As sequências como um todo, no entanto, foram muito variadas. De modo geral, pode-se dividir a corte em três etapas, baseadas na divisão feita em Klein & Araújo (2010):

*Fase aérea* (macho e fêmea em voo): Pode iniciar-se com o encontro entre macho e fêmea em voo ou com a fêmea levantando voo e o macho a perseguindo. As três UCs que podem ocorrer são *spiraling flight*, *flight pursuit* e *flight interaction*. Todas normalmente levam a fêmea a pousar, seguindo-se a próxima fase, mas também pode se dar a separação do casal.

*Fase mista* (macho em voo e fêmea pousada): Pode iniciar-se com o macho em voo encontrando a fêmea pousada ou quando a fêmea pousa após alguma interação na *fase aérea*. Normalmente o macho executa *hovering* e pousa em seguida, iniciando a *fase solo*, mas a fêmea também pode levantar voo, voltando-se para a *fase aérea* ou apenas se afastando do macho. Em resposta ao *hovering* ou à simples aproximação do macho fêmeas receptivas geralmente fecham as asas e podem executar *contraction*. Alternativamente, com as asas abertas ela pode executar *wings spread* ou *fast flapping*.

*Fase solo* (macho e fêmea pousados): Inicia-se com o macho pousando muito próximo da fêmea, normalmente executando em seguida *androconia exposition*, enquanto curva o abdômen algumas vezes para tentar o acoplamento genital. Caso tenha sucesso, cessa o batimento das asas e gira até a ficar na posição antiparalela com a fêmea, permanecendo ambos de asas fechadas em cópula. Pode se dar também um período de latência, *slow flapping* ou a fêmea levanta voo, voltando-se para a *fase aérea* se o macho a perseguir ou

encerrando a corte. Em resposta à *androconia exposition* é mais comum a fêmea executar *fast flapping* ou *contraction*. Fêmeas menos receptivas mantêm as asas abertas e podem executar *wings spread*, impedindo o acesso à genitália.

#### *Análise comparada*

Foi possível reconhecer três diferenças entre a corte de *H. erato phyllis* (Klein & Araújo 2010), *H. besckei* (observações preliminares) e *H. ethilla narcaea*. Um sumário destas diferenças está organizado na tabela 2. Para as demais UCs, até o momento não foram identificadas diferenças consistentes. O comportamento mais notável da corte de *H. ethilla* que não ocorreu nenhuma vez nas outras duas espécies foi o *spiraling flight*. Também foi evidente a postura de rejeição diferenciada das fêmeas. Nas três espécies a abertura completa (180°) das asas impede a aproximação do macho necessária para o acoplamento genital. Apenas em *H. ethilla*, contudo, esta postura é acompanhada da elevação do abdômen, o que dificulta ainda mais a efetivação da cópula. A terceira unidade comportamental para a qual uma diferença clara foi percebida é o batimento rápido das asas da fêmea, frequentemente acompanhado da exposição da glândula abdominal amarela, que ocorre principalmente em resposta à *androconia exposition* pelo macho, mas também pode se dar perante o *hovering*. Este comportamento havia sido denominado *posterior vibration* em *H. erato* justamente por ser movido apenas o par posterior de asas, mantendo as anteriores fechadas. Em *H. ethilla* e *H. besckei*, contudo, os dois pares de asas movem-se juntos e a abertura não é tão pronunciada quanto em *H. erato*.

## DISCUSSÃO

### *Etologia comparada da corte*

O comportamento de corte das três espécies de *Heliconius* comparadas aqui apresentam as mesmas composição e estrutura gerais. Além disso, este estudo reforça a asserção de Klein & Araújo (2010) de que a exposição das androcônias é um componente necessário para a aquisição da cópula, tratando-se, portanto, de um requisito provavelmente compartilhado por todo o gênero e envolvido na comunicação química entre macho e fêmea (Crane 1955). Se considerarmos apenas a sequência mais simples (i.e. sem repetição de fases) que leva à cópula, obtemos o padrão de que para as três espécies (1) o macho pode encontrar uma fêmea em voo ou pousada, (2) o primeiro tipo de encontro é seguido por uma interação em voo, que induz a fêmea a pousar, (3) após o segundo tipo de encontro ou na sequência da fase 2 o macho executa *hovering*, pousando em seguida, e por fim (4) ele executa *androconia exposition* até conseguir o acoplamento genital. Esta ‘sequência padrão’ varia no grau de complexidade, dependendo do nível de atividade do macho e da receptividade da fêmea, fatores que podem gerar períodos de latência ou a alternância cíclica entre as fases *aérea*, *mista* e *solo* (ver figura 2). Apesar desta variabilidade intraespecífica, contudo, a análise permitiu a identificação de diferenças consistentes de padrões de movimento e postura *entre* as espécies. A mais marcante foi o voo espiralado (*spiraling flight*) exclusivo de *H. ethilla*. Este tipo de comportamento entre macho e fêmea já foi relatado também para *Dryas iulia alcionea* (Mega & Araújo 2009), um heliconíneo pertencente a um dos ‘gêneros basais’ (i.e. mais primitivos). Coincidentemente, *Dryas iulia* apresenta asas mais estreitas e alongadas, se assemelhando mais à forma das asas de *H. ethilla* do que às de *H. erato* e *H. besckei* (observações pessoais). *H. ethilla* também difere das outras duas espécies do gênero por apresentar comportamento de voo mais

veloz, o que também é coincidente com *Dryas iulia*, além de voar em estratos mais altos da vegetação, o que torna sua captura um pouco mais difícil (observações pessoais). Outra coincidência entre os comportamentos de corte de *Dryas iulia* e *H. ethilla* é a postura denominada aqui *wings spread*, executada por fêmeas e que se trata provavelmente de um sinal de rejeição. Novamente, este comportamento não foi visto nas outras duas espécies de *Heliconius*. Por fim, o padrão de bater rapidamente apenas as asas posteriores quando expõe a glândula abdominal (*posterior vibration*), exclusivo das fêmeas de *H. erato*, pode ter relação com a existência de um antiafrodisíaco depositado por machos no momento da cópula que evita assédios infrutíferos nesta espécie monândrica (Gilbert 1976, Schulz et al. 2008, Estrada et al. 2010). O comportamento de *H. erato* pode ser um potencializador da emissão deste sinal, menos importante em *H. ethilla* e *H. besckei*, cujas fêmeas podem copular mais de uma vez.

#### *Convergência comportamental entre mímicos?*

A simples análise de caracteres comportamentais compartilhados e exclusivos entre a corte das três espécies de *Heliconius* deste estudo não fornece evidências suficientes para a aceitação ou rejeição da hipótese de convergência comportamental entre mímicos. Considerando, contudo, que esta hipótese é baseada na relação indireta entre forma das asas e comportamento de corte, que se daria através da relação direta entre forma das asas e comportamento de voo, torna-se mais importante o comportamento *spiraling flight*, uma vez que é o único que consiste em um tipo de voo. Esta unidade comportamental, assim, sendo um importante componente da corte de *H. ethilla* (figuras 1 e 2) e sendo ausente em *H. erato* e *H. besckei*, corrobora a hipótese de convergência para o comportamento de corte de *H. besckei* em direção à *H. erato*. A maior similaridade morfológica das asas de *H. besckei* com *H. erato*, um co-mímico distante filogeneticamente, do que com a espécie

proximamente aparentada não co-mimética *H. ethilla* (embora ainda não demonstrada quantitativamente) pode ser o produto primário da seleção natural para mimetismo locomotor (Srygley 1994, 1999, 2004, Jones et al. 2013), resultando em comportamentos de voo mais semelhantes, o que por fim resultaria em voos mais semelhantes também no contexto sexual. A convergência de nichos ecológicos entre co-mímicos (Elias et al. 2008) pode ser um fator complementar ou alternativo ao mimetismo locomotor como causa da convergência morfológica das asas. Por fim, a estratificação vertical de complexos miméticos, ou seja, o compartilhamento de uma mesma faixa de alturas de voo na vegetação entre co-mímicos e a não sobreposição com outros complexos miméticos (Papageorgis 1975, Brown 1988) também é uma possível causa da seleção convergente entre *H. besckei* e *H. erato*, divergindo de *H. ethilla*. Esta última possibilidade é reforçada pelo fato de *H. ethilla* ser frequentemente observada voando em altitudes maiores do que *H. besckei* e *H. erato* (observações pessoais).

Independentemente da pressão seletiva mais importante que atuou sobre a forma das asas nestas espécies, uma correlação entre este traço, comportamento de voo e comportamento de corte, juntamente com a maior semelhança dentro dos pares *Dryas iulia*-*H. ethilla* e *H. erato*-*H. besckei* do que entre eles merece ser mais bem explorada. A influência indireta da seleção natural ecológica para mimetismo ou para diferentes demandas de voo sobre o comportamento de corte pode trazer importantes implicações evolutivas para processos de divergência entre populações e especiação, bem como novas relações de *trade-offs* entre adaptações. A análise detalhada do comportamento de corte em outras espécies de heliconíneos também tem o potencial de elucidar este cenário, bem como estabelecer um quadro mais amplo sobre a evolução de caracteres comportamentais reprodutivos neste grupo tão bem estudado de borboletas.



Este estudo, conforme já mencionado acima, encontra-se em andamento. A descrição e quantificação precisas do comportamento de corte de *H. besckei* deverá trazer mais robustez à análise comparada e possíveis novos *insights* sobre a evolução da corte no gênero, bem como reforçar a hipótese de convergência entre mímicos, caso o padrão observado até aqui seja mantido.

## **AGRADECIMENTOS**

Somos gratos aos integrantes do Laboratório de Genética Ecológica que colaboraram com as capturas e a criação de borboletas e lagartas durante este estudo (Ana Carolina Bahi Aymone, Ana Carolina Silva, Etiele Senna Luciana Silva, Bruna Missagia, Janaína De Nardin, Marcelo Costa e Pietro Pollo). Também agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida a um dos autores (ALK).

## **REFERÊNCIAS**

Brown, K. S. 1988: Mimicry, aposematism and crypsis in neotropical Lepidoptera: the importance of dual signals. *Bulletin de La Société Zoologique de France*, **113**, 83–101

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.

- Darwin, C. R. 1871: The descent of man and selection in relation to sex. 2nd ed. John Murray, London.
- Eibl-Eibesfeldt, I. 1979: Etologia: Introducción al estudio comparado del comportamiento. 2nd ed. Ediciones Omega, Barcelona, 643p.
- Elias, M., Gompert, Z., Jiggins, C., & Willmott, K. 2008: Mutualistic interactions drive ecological niche convergence in a diverse butterfly community. PLoS biology, **6**(12), e300.
- Estrada, C., Yildizhan, S., Schulz, S. & Gilbert, L. E. 2010: Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. Proc Biol Sci. **277**(1680): 407–413.
- Estrada, C. & 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.
- Fagen, R. M., Young, D. Y. 1978: Temporal Patterns of Behavior: intervals, latencies and sequences. In: Colgan PW (ed) Quantitative Ethology, Wiley, New York, pp. 78-114.
- Friberg, M., Vongvanich, N., Borg-Karlson, A. K., Kemp, D. J., Merilaita, S., & Wiklund, C. 2008: Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. Behavioral Ecology and Sociobiology, **62**(6), 873-886.
- Gilbert, L.E. 1976: Postmating female odor in *Heliconius* Butterflies - male-contributed anti-aphrodisiac. Science **193**: 419–420.
- Jones, R. T., Poul, Y. L., Whibley, A. C., Mérot, C., & Joron, M. 2013: Wing shape variation associated with mimicry in butterflies. Evolution, **67**(8), 2323-2334.
- 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.
- Mega, N. O., Araújo, A. M. 2009: Analysis of mating behavior and some possible causes of male copulatory success in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera; Nymphalidae; Heliconiinae). Journal of Ethology, **28**(1), 123-132

- Merrill, R. M., Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak, K. M., Llaurens, V., Martin, S. H., Montgomery, S. H., Morris, J., Nadeau, N. J., Pinharanda, A. L., Rosser, N., Thompson, M. J., Vanjari, S., Wallbank, R. W., Yu, Q. 2015: The diversification of *Heliconius* butterflies: what have we learned in 150 years? *J Evol Biol.* **28**(8):1417-38
- Papageorgis, C. 1975: Mimicry in neotropical butterflies. *American Scientist*, *63*, 522-532.
- Pinzari, M. & Sbordoni, V. 2012: Species and mate recognition in two sympatric Grayling butterflies: *Hipparchia fagi* and *H. Hermione genava* (Lepidoptera). *Ethology, Ecology & Evolution* **25**(1): 28-51.
- Pinzari, M. 2009: A comparative analysis of mating recognition signals in graylings: *Hipparchia statilinus* vs. *H. semele* (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). *Journal of insect behavior*, **22**(3), 227-244.
- Schulz, S., Estrada, C., Yildizhan, S., Boppré, M., & Gilbert, L. E. 2008: An antiaphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. *Journal of chemical ecology*, **34**(1), 82-93.
- Srygley, R. B. 1994: Locomotor mimicry in butterflies? The associations of positions of centres of mass among groups of mimetic, unprofitable prey. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **343**(1304), 145-155.
- Srygley, R. B. 1999: Locomotor mimicry in *Heliconius* butterflies: contrast analyses of flight morphology and kinematics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **354**(1380), 203-214.
- Srygley, R. B. 2004: The aerodynamic costs of warning signals in palatable mimetic butterflies and their distasteful models. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**(1539), 589-594.
- Tinbergen, N. 1972: The behavior of the grayling butterfly, pp. 197-294. In: Allen G., Ed. Unwin Led Edits. 1932-1972. *The Animal in Its World: Explorations of an Ethologist*. Vol. I. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Tinbergen, N. 1941: Ethologische Beobachtungen am Samtfalter, *Satyrus semele* L.  
Journal für Ornithologie, 89: 132–144

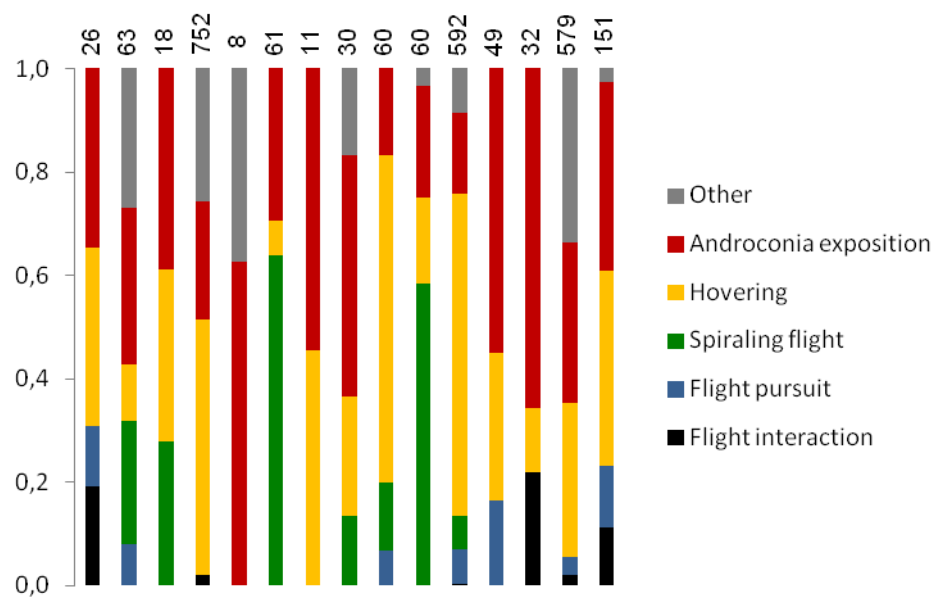
**Table 1.** Ethogram of *Heliconius ethilla narcaea* in male-female interactions.

Behavioral unit	Description
Male	
<i>Hovering</i>	The male remains in flight over the alighted female (5-15 cm of distance) without considerable displacement.
<i>Androconia exposition</i>	Alighted, next to the female (< 3 cm), the male flaps the wings quickly with a small angle of opening and separates the forewings from the hindwings, exposing the silver colored area of the forewings where the androconia are located.
<i>Slow flapping</i>	Alighted, next to the female (<3 cm), the male opens and closes the wings slowly.
Male and female	
<i>Flight interaction</i>	Any encounter in flight that does not initiate a <i>flight pursuit</i> or a <i>spiraling flight</i> but that is followed by a trajectory change of at least one of the individuals.
<i>Flight pursuit</i>	Any interaction in flight in which at least once the male pursues the female in a fast flight with sudden direction changes, touching her often, principally on the posterior and ventral regions.
<i>Spiraling flight</i>	Any interaction in flight in which at least once the male and female flight in a circular route (15-20 cm of diameter) fast and near each other, sometimes with a little rising. Touching can occurs.
Female	
<i>Wings spread</i>	Alighted, the female spreads the wings completely and usually raises the abdomen.
<i>Fast flapping</i>	Alighted, the female flaps wings quickly. Usually each flapping doesn't last more than 1-3 seconds. Frequently a yellow gland is exposed at the tip of the abdomen.
<i>Contraction</i>	Alighted and wings-closed, the female approximates both fore and hindwings, increasing their overlapping area.

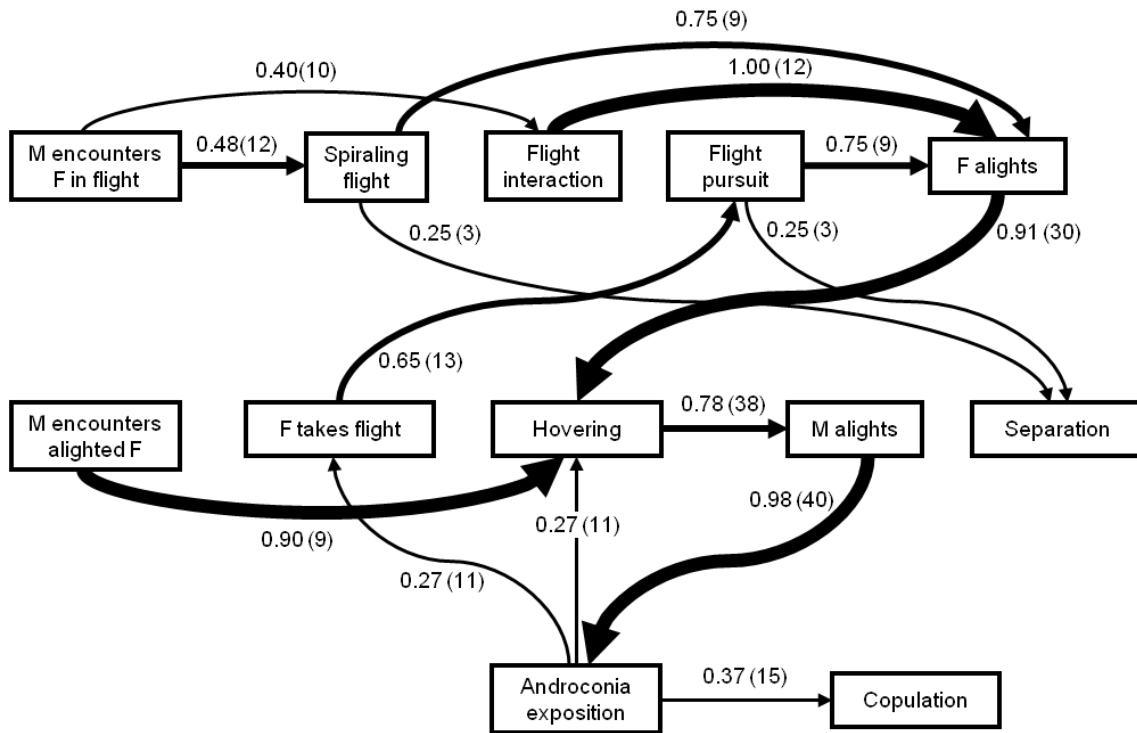
**Table 2.** Behavioral differences of courtship components between *Heliconius* species executed by females (F) or both sexes simultaneously (M, F).

	Flight interactions (M,F)	Opening of wings (F)	Fast flapping (F)
<i>H. ethilla narcaea</i>	Spiraling, pursuit and normal	Raised abdomen	Anterior and posterior
<i>H. besckei</i>	Pursuit and normal	Abdomen down	Anterior and posterior
<i>H. erato phyllis</i>	Pursuit and normal	Abdomen down*	Only posterior wings

\* Mated females may also separate forewings from hindwings, exposing the overlap margins (see Klein & Araújo 2010)

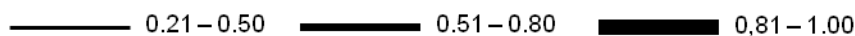


**Figure 1.** Composition of successful courtships of *Heliconius ethilla narcaea* based on the proportion of time spent in each behavioral unit. Each column represents an individual observation and the total time (seconds) of interaction during the observation is on the top of the column. Behavioral units are detailed in table 1 (ethogram).



**Figure 2.** Structure of interactions in successful courtships of *Heliconius ethilla narcaea* based on first-order Markov transitions (see “materials and methods”). Only transitions with probability greater than 0.20 and more than 2 occurrences are represented. The first line of rectangles includes male-female encounter in flight and *aerial stage* of courtship, where both are in flight; the second line includes the female being encountered alighted, the separation between male and female and *mixed stage*, where male (M) is in flight and female (F) alighted; and the third line includes *ground stage* and genital plugging (copulation), where both are alighted. Arrow thickness is proportional to the transition probability, which is indicated on it (see legend below), and the absolute number of times that transition occurred is presented in parenthesis.

Arrow thickness and probabilities interval (Fig. 3):



## DISCUSSÃO GERAL

### *Síntese dos resultados*

1. O mimetismo entre *Heliconius erato* e *H. besckei* é muito mais pronunciado em termos de indiscriminabilidade visual do que os mimetismos intergenéricos analisados, sendo também o único par com todas as cores indiscrimináveis entre as espécies para um tipo de predador – as aves com visão tipo-V.
2. O amarelo, principalmente na face dorsal das asas, é o principal candidato dentre as cores para sinal críptico de reconhecimento específico entre *H. erato* e *H. besckei*. O vermelho, por outro lado, é inviável como sinal de discriminação, principalmente pelas próprias borboletas.
3. Entre *H. erato* ou *H. besckei* e *Eresia lansdorfi* a única cor com baixa discriminabilidade é o vermelho da face ventral das asas.
4. Entre *H. ethilla* e *Mechanitis lysimnia* ou *Placidina euryanassa* o amarelo dorsal também é o mais provável sinal de reconhecimento específico pelas borboletas *Heliconius*, mas com uma amplitude muito maior de discriminabilidade nestes pares do que no par intragenérico (item 2). Esta diferença no amarelo é reduzida em quase cinco vezes entre *M. lysimnia* e *P. euryanassa*.
5. O sistema visual tetracromático de borboletas é o que melhor discrimina as cores entre pares miméticos quando um ou ambos os membros possuem este tipo de visão, enquanto que o único caso em que uma cor é mais bem discriminada pelo sistema tricromático ocorre no par em que ambos os membros possuem este tipo de visão.
6. Os *oil droplets* das aves não implicam em uma melhora significativa na discriminação entre as presas miméticas analisadas. Seus efeitos sobre a eficiência desta tarefa são ambíguos.



7. Os sinais visuais (modelos de borboletas isentos de sinais químicos) são suficientes para atrair a atenção de machos coespecíficos e provocar tentativas de interação.
8. Os machos de *H. besckei* não discriminam visualmente entre coespecíficos e comímicos de *H. erato*, sendo inclusive levemente mais atraídos pela coloração de *H. erato* do que pela de sua própria espécie.
9. Os machos de *H. erato* também não discriminam visualmente entre coespecíficos e comímicos de *H. besckei*, não apresentando nenhum tipo de preferência.
10. O isolamento reprodutivo entre *H. besckei* e *H. ethilla* a partir da coloração das asas é assimétrico. Os machos da segunda espécie apresentam um grau de preferência pelo padrão coespecífico consideravelmente menor do que os da primeira.
11. Os machos de *H. ethilla* não são capazes de discriminar entre coespecíficos e comímicos de *Mechanitis lysimnia* a partir de diferenças na coloração das asas.
12. A composição e estrutura da corte de *H. erato*, *H. besckei* e *H. ethilla* apresentam as mesmas composição e estrutura gerais.
13. A exposição das androcônias é o único comportamento dos machos necessário para a aquisição da cópula nas três espécies.
14. As fêmeas de *H. erato* possuem pelo menos uma unidade comportamental exclusiva da espécie em seu repertório, possivelmente relacionada com a emissão do antiafrodisíaco.
15. A análise comparada de unidades comportamentais sugere uma convergência comportamental entre *H. besckei* e *H. erato* e uma maior semelhança entre *H. ethilla* e *Dryas iulia*, uma espécie mais basal, possivelmente relacionada com regimes seletivos atuando sobre a forma das asas e tipo de voo.

## Trade-offs na evolução de sinais: os casos de *Heliconius*

A caracterização físico-sensorial das cores das asas apresentada no primeiro artigo deste estudo fornece uma base sólida para se procurar por diferenças que possam ter relevância ecológica para os organismos envolvidos com a emissão e/ou a recepção destes sinais. Dentre estes organismos estão, logicamente, os próprios portadores das cores, os quais devem ser compreendidos em quatro diferentes contextos: (1) como sinalizador intraespecífico (i.e., para parceiros em potencial), (2) como sinalizador para presas em potencial, (3) como sinalizador para indivíduos que compartilham destes ou de outros sinais de comunicação (i.e, co-mímicos ou espécies próximas filogeneticamente) e (4) como receptores dos mesmos sinais, emitidos por indivíduos coespecíficos. Estes quatro contextos, como se percebe, acrescentam mais duas categorias de organismos envolvidos com a emissão e/ou recepção das cores das asas, além dos próprios portadores das cores: borboletas de outras espécies, principalmente co-mímicos, e predadores visualmente guiados. A interpretação dos dados da caracterização físico-sensorial dentro deste cenário complexo deve ser guiada, ainda, pelas diferentes pressões seletivas resultantes de cada situação sinalizador-receptor. Torna-se indispensável, neste momento, uma avaliação, ainda que provisória, da importância relativa de cada pressão seletiva. Por um lado, têm-se os custos resultantes de falhas no isolamento reprodutivo etológico – a interferência reprodutiva. Apesar da relativamente bem conhecida consequência extrema da interferência reprodutiva em *Heliconius* – a hibridação (Mallet et al. 2007, Naisbit et al. 2002), até o momento não foi feita uma estimativa dos custos do assédio sexual interespecífico para machos e fêmeas. De qualquer modo, as principais possibilidades de formas pelas quais estes custos se dariam são a redução de tempo e energia despendidos (1) na procura e cortejo de fêmeas coespecíficas pelos machos, (2) na procura por plantas

hospedeiras para oviposição pelas fêmeas e (3) na procura por fontes de alimentação (néctar e pólen) por ambos os sexos. Por outro lado, têm-se os custos resultantes de imperfeições no mimetismo. Kikichi & Pfennig (2013) discutem 11 hipóteses não excludentes para a persistência de imprecisões do mimetismo na natureza, agrupadas em quatro categorias mais abrangentes de explicação: (1) a imperfeição é na verdade um artefato da percepção humana, irrelevante para os receptores dos sinais do mimetismo, isto é, os predadores; (2) restrições genéticas ou de desenvolvimento, que impedem uma resposta para a seleção sobre o melhoramento do mimetismo; (3) seleção relaxada, onde o mimetismo imperfeito é tão bom quanto o mimetismo perfeito; e (4) *trade-offs*, onde o mimetismo imperfeito é localmente mais adaptativo do que o mimetismo perfeito. O tipo de análise que fizemos no primeiro artigo deste estudo, levando-se em consideração a perceptibilidade das cores por diferentes sistemas visuais, elimina automaticamente a primeira categoria, de modo que nos deteremos agora às outras três. É importante notar que a segunda categoria, que ocorre quando, por exemplo, não há variação genética suficiente na população para se atingir uma maior precisão mimética, é mais provável quanto maior a distância filogenética entre as espécies envolvidas. Dentre os casos que analisamos, portanto, torna-se menos aplicável ao par intragenérico do que aos demais, sendo provavelmente parte da explicação, no mínimo, das diferenças encontradas entre estes dois grupos. De acordo com a hipótese da seleção relaxada, espera-se uma menor precisão mimética quanto maior for a abundância da espécie modelo e a razão entre custos (toxicidade, agressão, tempo de manuseio) e benefícios (ganho calórico) para o predador de se atacar a espécie modelo. Para nossos propósitos, é relevante que consideremos a classificação mais recente do espectro do mimetismo, onde se inclui a categoria *quasi-Batesiano* (Speed 1993, Speed 1999, Balogh et al. 2008). De acordo com essa

classificação, o grau de defesa (p. ex. toxicidade) pode diferir mesmo entre co-mímicos Müllermanos, o que pode acarretar preferências dos predadores por uma ou outra espécie, bem como uma desvantagem do mimetismo para a espécie melhor protegida caso os predadores não consigam discriminá-las (do mesmo modo que um ‘modelo’ Batesiano). Assim, no cenário da seleção relaxada, quanto pior for uma espécie como presa e quanto mais abundante ela for, menor é será a abundância da espécie menos protegida e conseqüentemente menor será a pressão seletiva para perfeição do mimetismo, pois apenas uma pequena fração da população da espécie menos protegida será atacada. Esta mesma situação pode ainda gerar uma “corrida” fenotípica da espécie mais protegida para divergir de seu mímico, potencializando ainda mais a imperfeição do mimetismo. Nas espécies que analisamos, apesar de nenhum estudo ter sido feito neste sentido, pelo menos uma diferença de qualidade como presas pode ser inferida: o tamanho corporal. As três espécies de *Heliconius* são consideravelmente maiores do que *Placidina euryanassa* e, principalmente, do que *Mechanitis lysimnia* e *Eresia lansdorfi*. Esta diferença é ainda mais pronunciada entre *H. ethilla*, a maior dentre as três *Heliconius*, e *M. lysimnia*. Independentemente de outras características, portanto, as *Heliconius* proveriam maior ganho calórico do que seus mímicos e co-mímicos intergenéricos, o que por fim pode resultar em limitações para uma maior sobreposição de seus padrões de coloração.

Sete das 11 hipóteses selecionadas na revisão de Kikichi & Pfennig (2013) foram agrupadas na categoria ‘*trade-offs*’. Dentre estas se encontra a hipótese do ‘deslocamento de caracteres’, onde a imprecisão do mimetismo reflete um compromisso entre a seleção convergente mediada pelos predadores e a seleção divergente mediada pela competição por algum tipo de recurso. Estes recursos podem ser ‘fêmeas que emitem um sinal atrativo’, por exemplo, configurado na forma de interferência reprodutiva por confusão de sinais,

como já discorrido ao longo deste trabalho e demonstrado em *Heliconius* (Estrada & Jiggins 2008). Esta sobreposição de vias de comunicação, assim, pode gerar diferenças entre mímico e modelo ou entre co-mímicos, diminuindo a precisão do mimetismo. Nossas análises físico-sensoriais a princípio corroboraram a hipótese que vem sendo defendida recentemente de que as *Heliconius* desenvolveram paralelamente visão (tetracromática) e cor (o amarelo peculiar) como um canal privado de comunicação compatível com a sobreposição de padrões de coloração requerida para o mimetismo. Na verdade, encontramos uma maior discriminabilidade para esta cor também entre co-mímicos dentro do gênero, o que não era esperado, dado o compartilhamento do mesmo tipo de pigmento amarelo, com a ressalva de poder ser um subproduto da acuidade visual para discriminar qualquer diferença, mesmo intragenérica, na faixa de comprimentos de onda emitidos por este pigmento. Apesar disso, não havia até o momento nenhum teste comportamental que avaliasse o real uso de diferenças crípticas na coloração para o reconhecimento específico. Neste trabalho foi feita esta avaliação, a partir da qual não se encontrou suporte para a hipótese. É possível que o único par intergenérico analisado aqui neste quesito – entre *H. ethilla* e *Mechanitis lysimnia* – possa ser um caso excepcional em que as pressões para maior eficiência do reconhecimento específico não tenham sido fortes o suficiente para sobrepujar as pressões para aperfeiçoamento da similaridade nas cores. No entanto, demonstramos também que os machos de *H. ethilla* são consideravelmente atraídos até mesmo pela coloração de *H. besckei*, que não é co-mímica. Tal constatação leva a crer que níveis superiores (i.e. psicológicos, e não apenas fisiológicos) de discriminação sejam mais relaxados em *H. ethilla*. Independentemente da existência de diferenças perceptíveis nas cores e do aparato visual mais adequado para este fim, outros fatores seletivos podem ter atuado no sentido de diminuir a dependência de sinais visuais para o reconhecimento de

parceiros em *H. ethilla*, talvez discriminando entre coespecíficos e co-mímicos por vias químicas (Merot et al. 2015). Alternativamente, os machos podem utilizar uma estratégia menos criteriosa de localização de parceiros, abordando indiscriminadamente (em algum grau) borboletas que se enquadram em uma categoria fenotípica mais genérica. De fato, machos de *Heliconius* das três espécies já foram observados diversas vezes abordando, perseguindo e cortejando (incluindo tentativas de acoplamento genital) fêmeas de uma das outras duas espécies em cativeiro (observações pessoais). Além de sinais químicos, portanto, torna-se cada vez mais claro que as fêmeas possuem um papel fundamental no isolamento reprodutivo entre estas espécies. Algumas posturas de rejeição, bem como fugas, registradas durante o estudo do terceiro artigo podem ser a última barreira na sequência temporal de sinais de reconhecimento pelos machos, caso os demais falhem. Para que isto ocorra, contudo, torna-se novamente necessário algum tipo de sinal de reconhecimento específico, mas desta vez emitidos por machos e recebidos por fêmeas, como já sugerido também pelos resultados de Merot et al. (2015). A necessidade da exposição das androcônias como requisito mínimo e última etapa da corte nas três espécies verificada aqui e em um estudo anterior (Klein & Araújo 2010) também vai de encontro com esta importância da comunicação química no sentido de macho para fêmea e sugere seu papel na manutenção do isolamento reprodutivo.

A análise detalhada da corte nas três espécies centrais deste trabalho gera muito mais perguntas do que respostas, o que não está em completo desacordo com o pretendido. Como discorrido na introdução do terceiro artigo, estudos de etologia descritiva e comparada (assim como de história natural) servem muitas vezes para fundamentar hipóteses específicas a serem verificadas com outras abordagens posteriormente. Na verdade, a ideia de convergência comportamental entre mímicos, explorada no artigo em

questão, surgiu após as primeiras observações da corte de *H. besckei* e de *H. ethilla*, já tendo conhecida a corte de *H. erato*. Caso se confirme uma relação entre forma das asas, tipo de voo e comportamento de corte, o passo seguinte mais importante é procurar por uma relação entre a forma das asas e a convergência mimética entre estas espécies.

#### *Considerações finais e perspectivas*

Apesar de sua partição baseada em três diferentes abordagens – físico-sensorial, etológica experimental e etológica comparada – este estudo esteve o tempo todo de seu desenvolvimento amparado em uma estrutura integrada muito mais ampla, ainda que intuitiva, entre diversas disciplinas das ciências biológicas, estando mais próximas do ‘núcleo’ as ecologias sensorial, comportamental e evolutiva. As ideias apresentadas aqui, como tratam de interações entre espécies, tem implicações que podem ser expandidas para a compreensão da organização de comunidades e de processos de especiação. Faltam muitos ‘tijolos’, no entanto, para se alcançar algumas conclusões com maior confiança. É olhando para estudos anteriores a este e para as perspectivas geradas a partir deste, portanto, que se consegue tirar maior proveito dos resultados. Alguns se convertem na contradição (ou na exceção) de hipóteses que vêm sendo defendidas, ou lhes providenciam novas evidências; outros, ainda, geram novas perguntas ou redirecionam e aproximam o olhar para aspectos até então despercebidos. Acreditamos que este trabalho contribui também para diminuir a lacuna existente para as borboletas *Heliconius* da região Sul do Brasil. Tratam-se não apenas de populações diferentes, mas também espécies e ambientes únicos. É notável, inclusive, a falta que estudos da biologia básica e de história natural destas espécies faz para iluminar a leitura dos dados que encontramos.

A análise da forma das asas das três espécies, já digitalizadas, era a quarta abordagem a ser assumida nesta tese. Contudo, por imprevistos surgidos no último ano não foi possível realizá-la. Da mesma forma, fatores diversos, principalmente relacionados a dificuldades de criação de *Heliconius besckei* em viveiro, impossibilitaram um maior aprofundamento na investigação do seu comportamento de corte. Estas duas, assim, são as primeiras etapas a serem retomadas após este estudo, dando-lhe continuidade. Por fim, têm-se o que acredito ser um subproduto de praticamente toda pesquisa científica, bem como da simples atenção natural à nossa volta: observações casuais. Anotações referentes a horários e locais de captura de todos os indivíduos que de alguma forma entraram neste estudo, bem como comportamentos e interações ocorridas em campo ou viveiro podem ser olhadas com mais atenção e, eventualmente, exploradas com novas observações, para então serem compartilhadas.

Durante o desenvolvimento deste doutorado também foram co-orientados por mim dois estudantes de iniciação científica das Ciências Biológicas da UFRGS. Seus trabalhos de conclusão de curso, embora não diretamente relacionados, tratam de problemas incluídos na temática geral aqui apresentada – coloração mimética e reconhecimento específico em borboletas – e constituem anexos desta tese.



## REFERÊNCIAS

Alexander RD, Marshall DC, Cooley JR, (1997) Evolutionary perspectives on insect mating. In: Choe JC, Crespi BJ, (eds) *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 4-31.

Andersson M (1994) *Sexual Selection*. Princeton University Press. New Jersey. 599p.

Arias CF, Muñoz AG, Jiggins CD, Mavárez, J, Bermingham E, Linares M (2008) A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology* 17: 4699-4712.

Aronsson M, Gamberale-Stille G (2008) Domestic chicks primarily attend to colour, not pattern, when learning an aposematic coloration. *Animal Behavior*; 75:417-423.

Aymone ACB, Lothhammer N, Valente VLS, Araújo AM (2014) Embryogenesis of *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae): A contribution to the anatomical development of an evo-devo model organism. *Development, Growth & Differentiation* 56(6):448-59.

Balogh AC, Gamberale-Stille G, Leimar O (2008) Learning and the mimicry spectrum: from quasi-Bates to super-Müller. *Animal Behaviour*, 76(5), 1591-1599.

Bates HW (1862) Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley: Lepidoptera: Heliconidae. *Transactions of the Linnean Society of London* 25 (1862) 495-566.

Baxter SW, Papa R Chamberlain N, Humphray SJ, Joron M Morrison C, Ffrench-Constant, RH, McMillan WO, Jiggins CD (2008) Convergent evolution in the genetic basis of müllerian mimicry in *Heliconius* butterflies. *Genetics* 180: 1567-1577.

Beltrán M, Brower AVZ, Jiggins CD (2010) [tolweb.org/Heliconius/72231/2010.07.21](http://tolweb.org/Heliconius/72231/2010.07.21) in The Three of Life Web Project.

- Beltran M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E, Mallet J (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. Soc.* 92: 221–239.
- Benson WW (1972) Natural selection for Miillerian mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science*, 176(4037), 936-939.
- Benson WW Brown KS, Gilbert LE (1976) Coevolution of plants and herbivores: *Passion flower butterflies*. *Evolution* 29: 659-680.
- Biezanko CM (1974) Plantas y otras sustancias alimenticias de las orugas de los lepidópteros uruguayos. *Revista do Centro de Ciências Rurais, Santa Maria*, v. 4, n. 2, p.107-148.
- Blum MJ (2007) Ecological and genetic associations across a *Heliconius* hybrid zone. *J. Evol. Biol.* 21: 330-341.
- Boggs CL (1981) Selection pressures affecting male nutrient investment at mating in heliconiine butterflies. *Evolution* 35: 931–940.
- Briscoe AD, Bybee SM, Bernard GD, Yuan F, Sison-Mangus MP, Reed, RD, Warren AD, Llorente-Bousquets J, Chiao C (2010). Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:3628–3633.
- Brower LP, Brower JVZ & Collins CT (1963) Experimental studies of mimicry. 7. Relative palatability and Mullerian mimicry among Neotropical butterflies of the subfamily Heliconiinae. *Zoologica* 48: 65–84.
- Brown KS (1979) *Ecologia Geográfica e Evolução nas Florestas Neotrópicas*. Unicamp, Campinas. Monografia de Livre Docência.
- Brown KS (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 427–456.
- 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. *Am. Nat.* 179:38–51.

Cardoso MZ (2005) New localities for *Heliconius besckei* Ménériés and *Heliconius sara* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Bahia, Brazil. *Neotropical Entomology* 34(6): 1007-1008.

Counterman BA, Araujo-Perez F, Hines HM, Baxter SW, Morrison CM, Lindstrom DP, Papa R, Ferguson R, Joron M, ffrench-Constant RH, Smith CP, Nielsen DM, Chen R, Jiggins CD, Reed RD, Halder G, Mallet J & McMillan WO (2010) Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in *Heliconius erato*. *PLoS* 6(2).

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.

Cronin TW & Caldwell RL (2002) Tuning of photoreceptor function in three mantis shrimp species that inhabit a range of depths. II. Filter pigments. *Journal of Comparative Physiology A* 188:187–197.

Dartnall HJA (1953) The interpretation of spectral sensitivity curves. *British Medical Bulletin* 9:24–30.

Darwin CR (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. 2<sup>nd</sup> ed. John Murray, London.

Deinert EI (2003) Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (eds) *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 91-108.

Deinert EI, Longino JT & Gilbert LE (1994) Mate competition in butterflies. *Nature* 370: 23–24.

Delhey K, Delhey V, Kempnaers, B, Petters A (2015) A practical framework to analyze variation in animal colors using visual models. *Behavioral Ecology* 26(2), 367–375.

- Elias M, Gompert Z, Jiggins C & Willmott K (2008) Mutualistic interactions drive ecological niche convergence in a diverse butterfly community. *PLoS biology*, 6(12), e300.
- Emsley MG (1965) Speciation in *Heliconius* (Lep., Nymphalidae): morphology and geographic distribution. *Zoologica NY* 50: 191-254.
- Emsley MG (1970) An observation on the use of color for species recognition in *Heliconius besckei* (Nymphalidae). *J. Lepid. Soc.* 24: 25.
- Endler JA (1990) On the measurement and classification of colour in studies of animal color patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 41:315–352.
- Endler JA, Westcott DA, Madden JR & Robson T (2005) Animal visual systems and the evolution of color patterns: sensory processing illuminates signal evolution. *Evolution* 59:1795–1818.
- Endler, JA., & Mielke PW. (2005). Comparing entire colour patterns as birds see them. *Biological Journal of the Linnean Society* 86:405–431.
- 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? *J. Evol. Biol.* 21: 749-760.
- Estrada C, Yildizhan S, Schulz S & Gilbert LE (2010) Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. *Proc Biol Sci.* 277(1680): 407–413.
- Ferguson LC & Jiggins CD (2009) Shared and divergent expression domains on mimetic *Heliconius* wings. *Evolution and Development* 11(5): 498-512.
- Finkbeiner SD, Briscoe AD & Reed RD (2014) Warning signals are seductive: Relative contributions of color and pattern to predator avoidance and mate attraction in *Heliconius* butterflies. *Evolution*, 68(12), 3410-3420.

- Fordyce JA, Nice CC, Forister ML, Shapiro AM (2002) The significance of wing pattern diversity in the Lycaenidae: mate discrimination by two recently diverged species. *Journal of Evolutionary Biology* 15(5): 871–879
- Freitas AVL, Trigo JR, Brown KS, Witte L, Hartmann T, Barata LES (1996) Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miralera cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology* 7: 61-67.
- Friberg M, Vongvanich N, Borg-Karlson AK, Kemp DJ, Merilaita S & Wiklund C (2008) Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(6), 873-886.
- Frisch K von (1914/1953) *The Dancing Bees: An Account of the Life and Senses of the Honey Bee*, Harvest Books New York, a translation of *Aus dem Leben der Bienen*, 5th revised edition, Springer Verlag.
- Garland T (2014) Trade-offs. *Current Biology* 24(2): 60-61
- Gilbert LE (1972) Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1403–1407.
- Gilbert LE (1976) Postmating female odor in *Heliconius* Butterflies - male-contributed anti-aphrodisiac. *Science* 193: 419–420.
- Gilbert LE, Forrest HS, Schultz TD & Harvey DJ (1988) Correlations of ultrastructure and pigmentation suggests how genes control development of wing scales of *Heliconius* butterflies. *Journal of Research on the Lepidoptera* 26(1-4): 141-160.
- Govardovskii VI, Fyhrquist N, Reuter T, Kuzmin DG & Donner K (2000) In search of the visual pigment template. *Visual Neuroscience* 17:509–528.
- Grimaldi D e Engel MS (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press: Cambridge
- Gröning J & Hochkirch A (2008) Reproductive interference between animal species. *Quart. Rev. Biol.* 83 (3): 257-282.

- Heliconius Genome Consortium (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487(7405), 94-98.
- Helmholtz H (1909/1962) Southall, J. P. C. (Ed.), *Treatise on physiological optics* (Vol. II). New York: Dover.
- Hering E (1878/1964) *Outlines of a theory of the light sense* (Traduzido por Hurvich, L. M. & Jameson, D.). Cambridge: Harvard University Press.
- Hunt DM, Carvalho LS, Cowing JA & Davies WL (2009) Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:2941–2955.
- 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.
- Jones RT, Poul YL, Whibley AC, Mérot C & Joron M (2013) Wing shape variation associated with mimicry in butterflies. *Evolution*, 67(8), 2323-2334.
- Kelber A, Vorobyev M & Osorio D (2003) Animal colour vision: behavioral tests and physiological concepts. *Biological Reviews* 78: 81–118.
- Kemp DJ, Herberstein ME, Fleishman LJ, Endler JA, Bennett AT, Dyer AG, Hart NS, Marshall J & Whiting MJ (2015) An integrative framework for the appraisal of coloration in nature. *American Naturalist* 185(6):705-24.
- Kikuchi DW, Pfennig DW (2013) Imperfect mimicry and the limits of natural selection. *The Quarterly Review of Biology*, 88(4), 297-315.
- 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: 409-420.
- Kronforst MR (2008) Gene flow persists millions of years after speciation in *Heliconius* butterflies. *BMC Evolutionary Biology*. 8(98).

- Kronforst MR, Young LG, Blume LM. & Gilbert LE (2006) Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. *Evolution* 60(6): 1254-1268.
- Liebman PA, Granda AM (1975) Super dense carotenoid spectra resolved in single cone oil droplets. *Nature* 253:370–372.
- Llaurens V, Joron M & Thery M (2014) Cryptic differences in colour among Mullerian mimics: how can the visual capacities of predators and prey shape the evolution of wing colours. *J. Evol. Biol.* 27: 531–540.
- Lubbock J (1889) *On the Senses, Instincts, and Intelligence of Animals: With Special Reference to Insects*. Kegan Paul, Trench & Co.: London.
- Lythgoe JN (1979) *Ecology of vision*. Oxford university press: Oxford.
- Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W & Linares M (2007) Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology* 7(28).
- Mallet J, McMillan WO & Jiggins CD (1998) Mimicry and Warning Color at the Boundary between Races and Species. In: *Endless Forms: Species and Speciation* Edited by: Howard, D. J. e Berlocher, S. H. New York: Oxford Univ. Press; 1998: 390-403.
- Mavárez J, Salazar CA, Birmingham E, Salcedo C, Jiggins CD & Linares M (2006) Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature* 441: 868-871.
- Maxwell JC (1860) On the theory of compound colours, and the relations of the colours of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 150:57–84.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press. 797 pp.
- McMillan WO, Jiggins CD & Mallet J (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 8628-8633.

- Melo M, Salazar C, Jiggins CD & Linares M (2009) Assortative mating preferences among hybrids offers a route to hybrid speciation. *Evolution* 63(6): 1660-1665.
- Mérot C, Frérot B, Leppik E, Joron M (2015) Beyond magic traits: Multimodal mating cues in *Heliconius* butterflies. *Evolution* 69(11), 2891-2904.
- Merrill RM, Gompert Z, Dembeck LM, Kronforst M, McMillan WO & Jiggins CD (2011) Mate preference across the speciation continuum in a clade of mimetic butterflies. *Evolution* 65(5): 1489-1500.
- Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak KM, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RW, Yu Q (2015) The diversification of *Heliconius* butterflies: what have we learned in 150 years? *J Evol Biol.* 28(8):1417-38
- Müller F (1879) *Ituna* and *Thyridia*: a remarkable case of mimicry in butterflies. Trans. Entomol. Soc. Lond 1879:xx–xxix.
- Muñoz AG, Salazar C, Castaño J, Jiggins CD & Linares M (2010) Multiple sources of reproductive isolation in a bimodal butterfly hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1312-1320.
- Naisbit RE, Jiggins CD, Linares M, Salazar C & Mallet J (2002) Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics* 161(4): 1517-1526.
- Nijhout HF (1991) *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns*. Smithsonian Institution press. Washington and London.
- Osorio D & Vorobyev M (2008) A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Research* 48:2042–2051.
- Pinzari M & Sbordoni V (2012) Species and mate recognition in two sympatric Grayling butterflies: *Hipparchia fagi* and *H. Hermione genava* (Lepidoptera). *Ethology, Ecology & Evolution* 25(1): 28-51.



- Reed RD, McMillan WO & Nagy LM (2008) Gene expression underlying adaptive variation in *Heliconius* wing patterns: non-modular regulation of overlapping cinnabar and vermilion prepatterns. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 275, 37–45.
- Reed RD, Nagy L (2005) Evolutionary redeployment of a biosynthetic module: expression of eye pigment genes *vermilion*, *cinnabar*, and *white* in butterfly wing development. *Evol Dev* 7: 301–311.
- Renoult JP, Courtiol A, Schaefer M (2013) A novel framework to study colour signalling to multiple species. *Functional Ecology* 27(3): 718–729.
- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP (2004) *Avoiding Attack. The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*. Oxford University Press: Oxford.
- Saarinen P, Pahlberg J, Herczeg G, Viljanen M, Karjalainen M, Shikano T, Merilä J & Donner K (2012) Spectral tuning by selective chromophore uptake in rods and cones of eight populations of nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*). *Journal of Experimental Biology* 215:2760–2773.
- Schulz S, Beccaloni G, Brown KS, Boppré M, Freitas AVL, Ockenfels P & Trigo JR (2004) Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochemical systematics and ecology*, 32(8), 699-713.
- Scoble MJ (1992) *The lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford univ. press, New York. 404 p.
- Silberglied RE (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.
- Speed MP (1993) Muellierian mimicry and the psychology of predation. *Animal Behaviour*, 45(3), 571-580.
- Speed MP (1999) Batesian, quasi-Batesian or Müllerian mimicry? Theory and data in mimicry research. *Evolutionary Ecology*, 13(7-8), 755-776.

- Srygley RB (1999). Locomotor mimicry in *Heliconius* butterflies: contrast analyses of flight morphology and kinematics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1380), 203-214.
- Stavenga DG (2010) On visual pigment templates and the spectral shape of invertebrate rhodopsins and metarhodopsins. *Journal of Comparative Physiology A* 196:869–878.
- Stoddard MC & Prum RO (2008). Evolution of avian plumage color in a tetrahedral color space: a phylogenetic analysis of new world buntings. *American Naturalist* 171:755–776.
- Tinbergen N (1972) The behavior of the grayling butterfly, pp. 197-294. In: Allen G., Ed. Unwin Led Edits. 1932-1972. *The Animal in Its World: Explorations of an Ethologist*. Vol. I. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Turner JR (1976) Adaptive radiation and convergence in subdivisions of the butterfly genus *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 58(4): 297-308.
- Vane-Wright RI & Boppré M (1993) Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 340: 197-205.
- Vorobyev M (2003) Coloured oil droplets enhance colour discrimination. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:1255–1261.
- Vorobyev M, & Osorio D (1998) Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:351–358.
- Wahlberg N (2001) The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 55, 522–537.
- Walker TJ (1974) Character displacement and acoustic insects. *American Zoologist* 14(4):1137–1150.
- Wyszecki G & Stiles WS (1982) *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae*. Wiley: New York.
- Yuan F, Bernard GD, Le J & Briscoe AD (2010) Contrasting modes of evolution of the visual pigments in *Heliconius* butterflies. *Mol. Biol. Evol.* 27: 2392–2405.

Zaccardi G, Kelber A, Sison-Mangus MP & Briscoe AD (2006) Opsin expression in the eyes of *Heliconius erato*. *Perception* 35:142–143.

**ANEXO 1:**

*Dimorfismo sexual e reconhecimento de parceiros em Heliconius ethilla narcaea*

*(Lepidoptera, Nymphalidae)*

Marcelo Carvalho Costa, André Luis Klein e Aldo Mellender de Araújo.

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*

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](mailto:aldo1806@gmail.com)

Email de Marcelo Carvalho Costa: [costa.celo@gmail.com](mailto:costa.celo@gmail.com)

## RESUMO

O dimorfismo sexual na coloração de *Heliconius ethilla narcaea* é 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. O presente trabalho visa caracterizar este dimorfismo qualitativa e quantitativamente através de análises de imagens das asas e testar experimentalmente a importância desta variação para o reconhecimento de parceiros pelos machos. Também é verificado se há dimorfismo no comprimento de onda das três cores que compõem o padrão das asas em questão através de espectrofotometria. É demonstrado que os machos são capazes de discernir entre os sexos utilizando-se apenas do padrão de coloração dimórfico e que 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 eficácia do 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 comímicos (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 e 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, Viamão e São Francisco de Paula, além do município paranaense de Paula Freitas. 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 reflectância 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<sup>a</sup> 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 aclave representativo de reflectância por volta de 350 nm, mas não se nota uma diferença consistente entre machos e fêmeas.

Esse mesmo aclave 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 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 comímicas 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

- 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

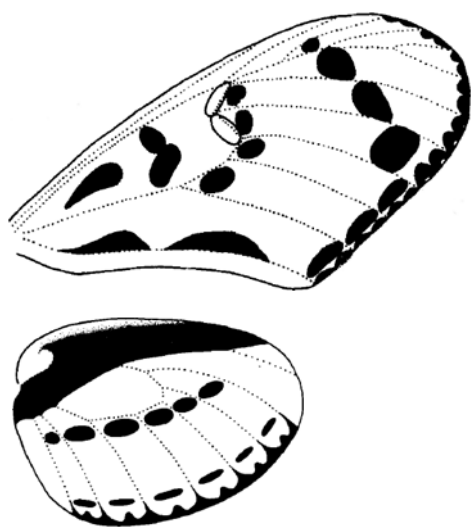
- Jiggins C, Naisbit R., Coe R, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* 411:302-305
- Klein AL, Araújo AM (2010) Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion 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](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 25 November 2013.

## ANEXOS



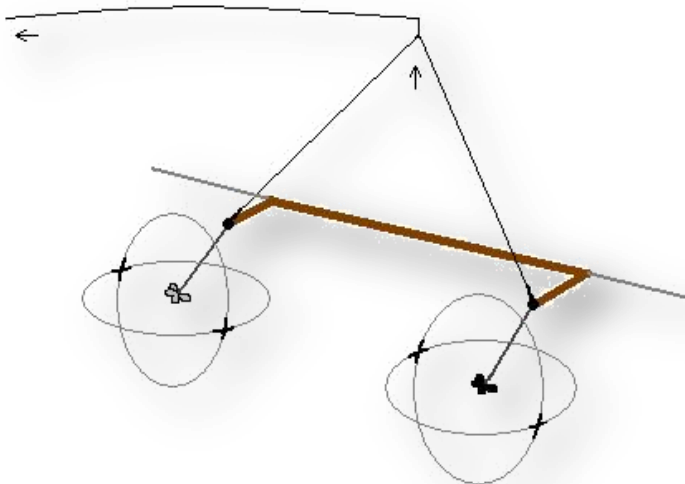
**Fig. 1** Derivação do padrão de manchas de *Heliconius* a partir do grupo dos ninfalídeos (modificado de Nijhout & Wray, 1988)



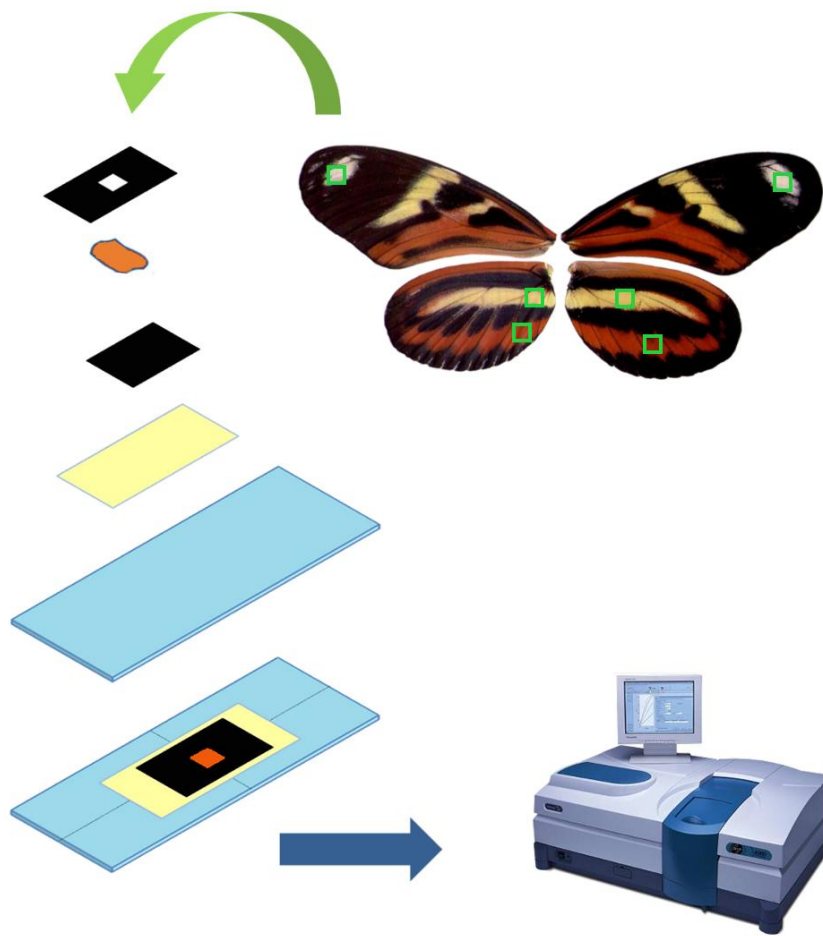
**Fig.2** *Heliconius ethilla narcaea*



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

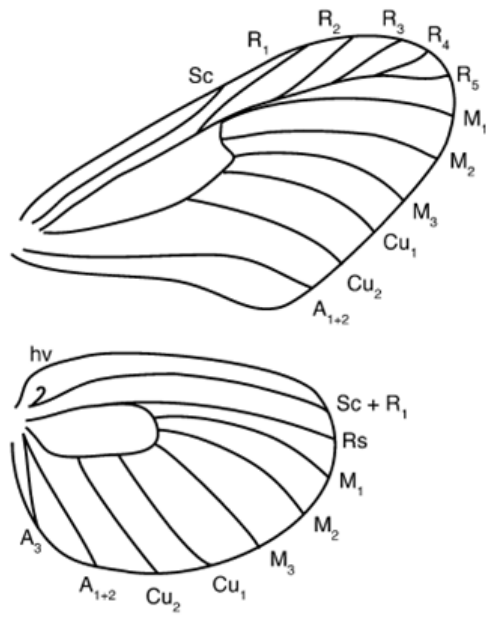


**Fig.4** Aparato utilizado para experimentos comportamentais

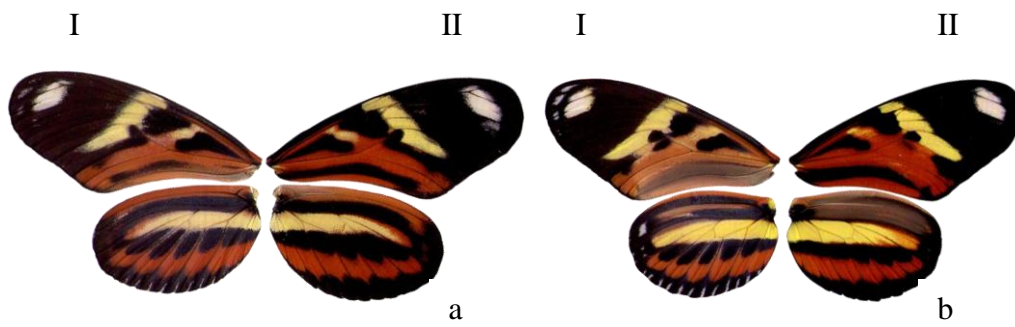


**Fig.5** Passos para a montagem e área de extração de material para uso em espectrofotometria.

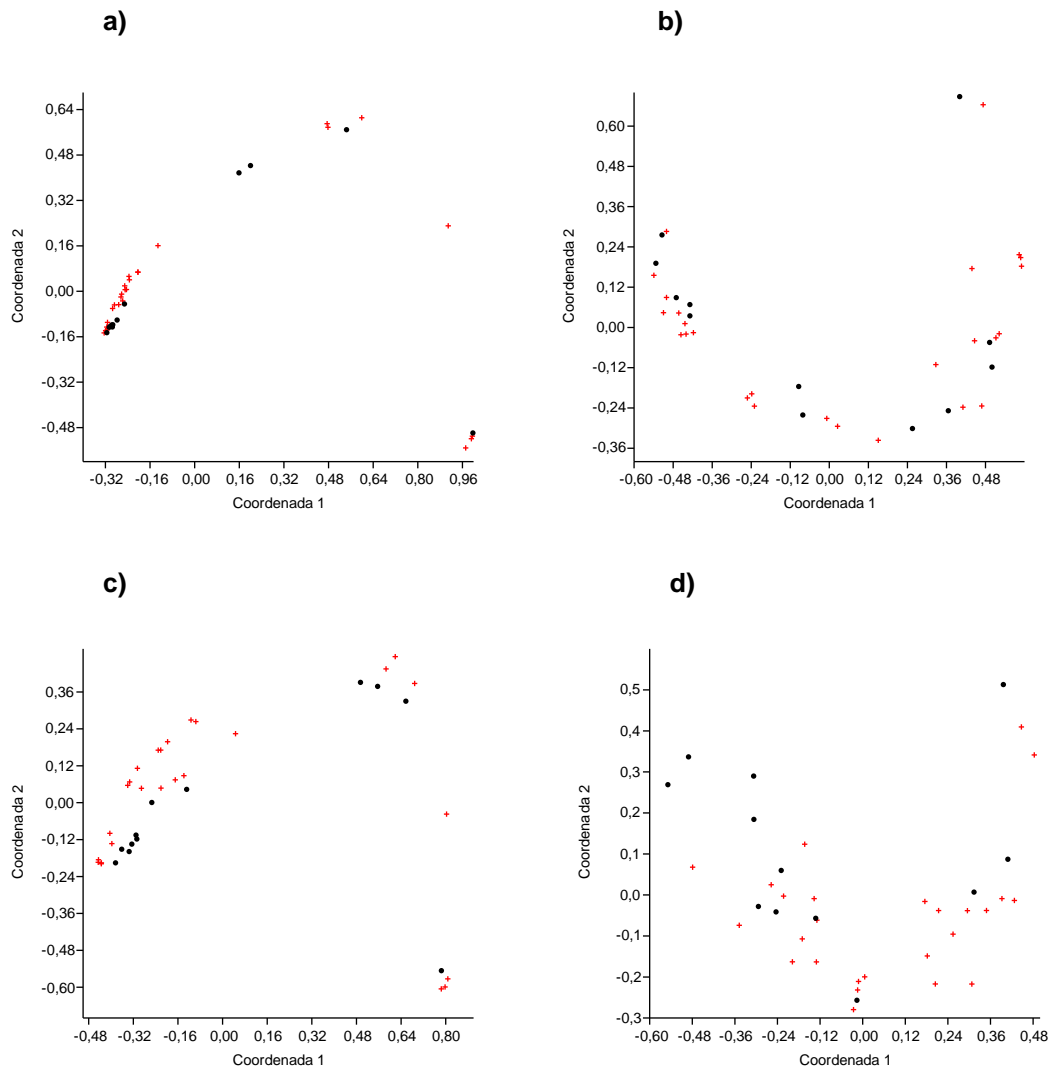




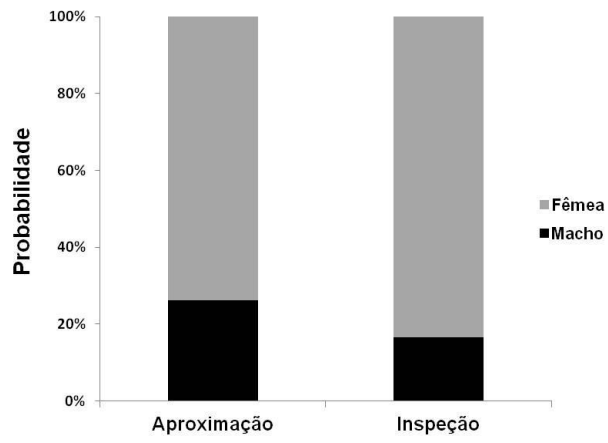
**Fig.6** - Padrão de venação em *Heliconius spp.* (modificado de Reed & Gilbert, 2004).



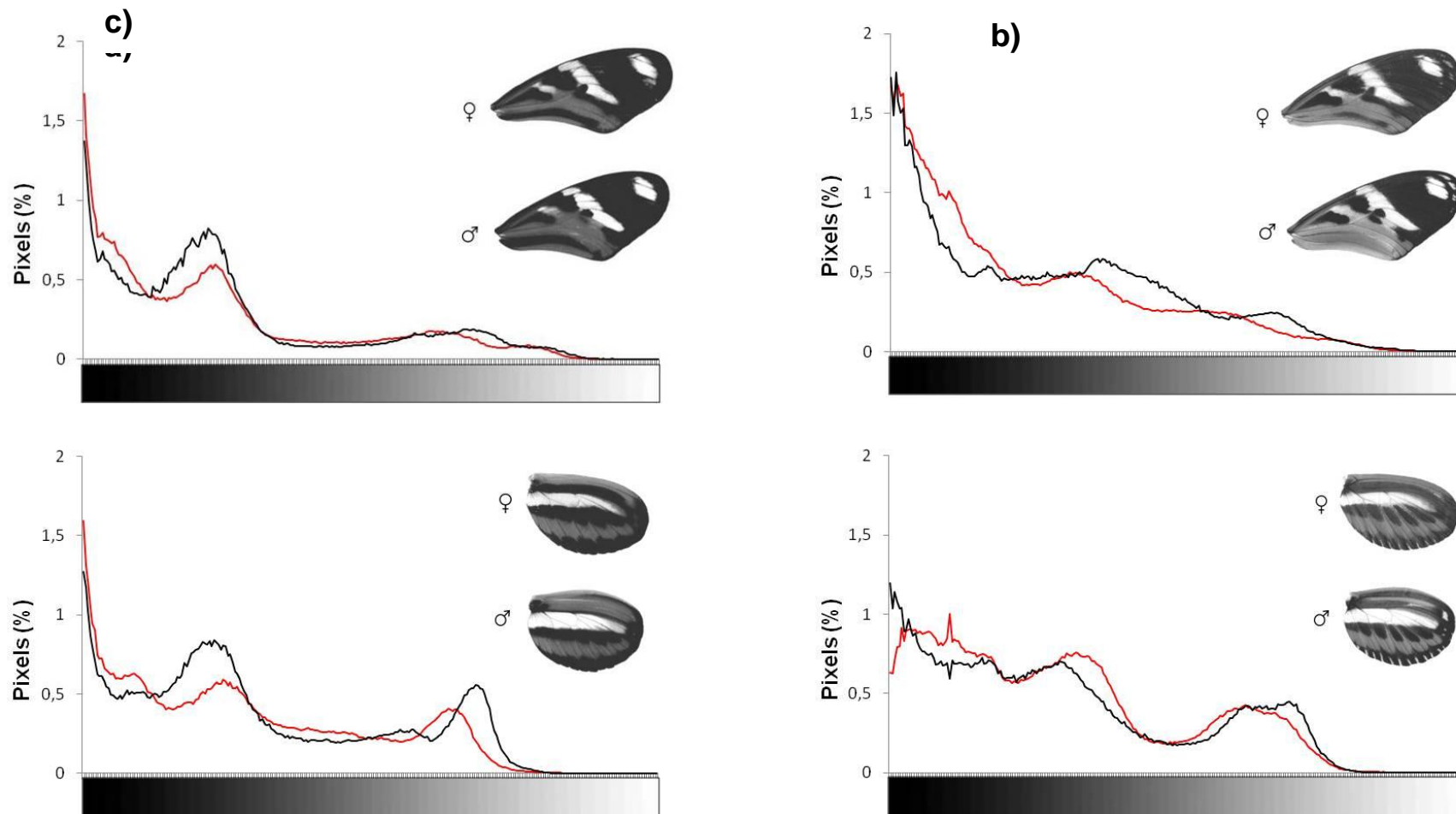
**Fig.7**- Asas anterior e posterior direitas de fêmea (a) e de macho (b) de *Heliconius ethilla narcaea*, vista ventral (I) e dorsal (II).



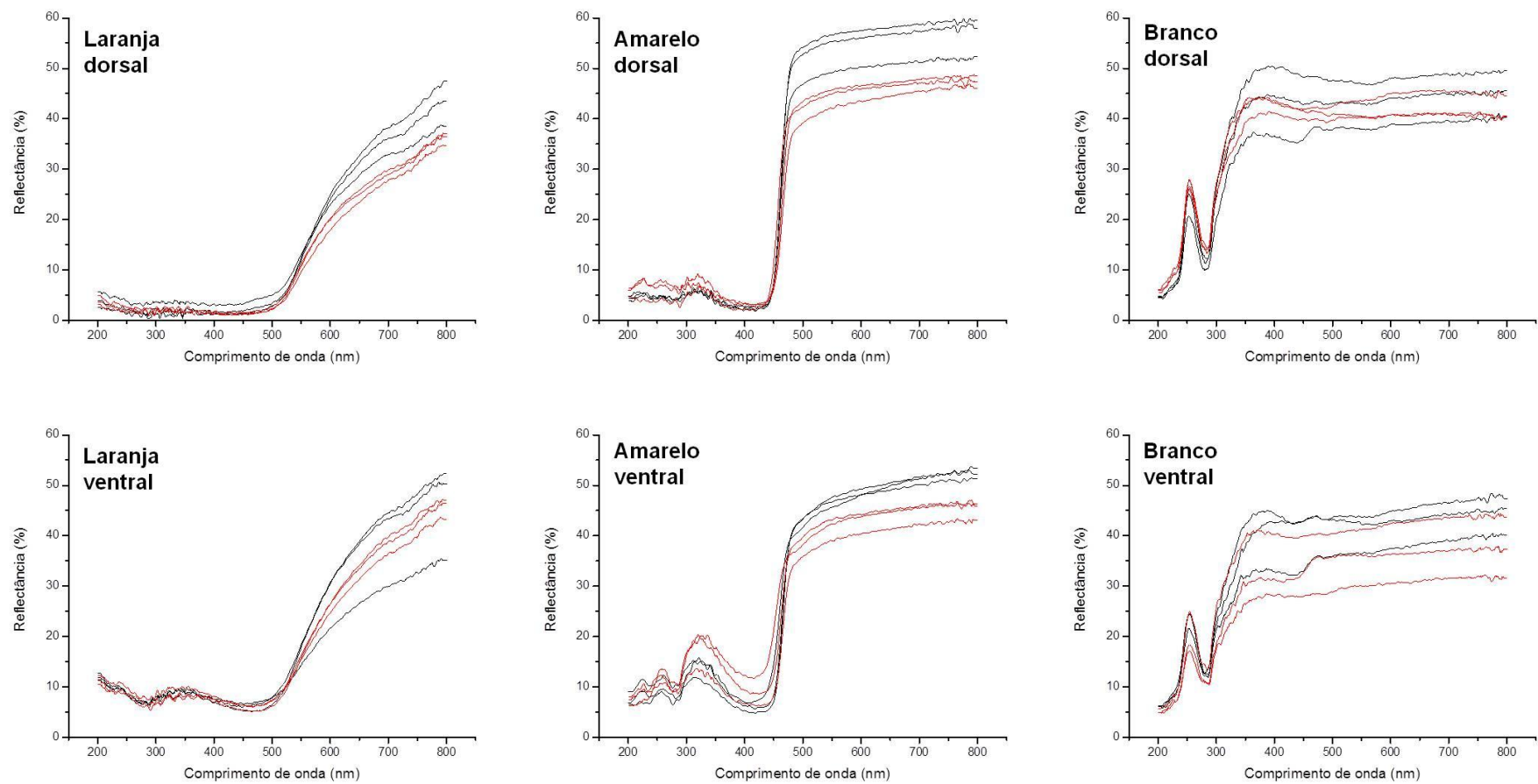
**Fig. 8** Análise de Coordenadas Principais (distância de corda) a partir das matrizes de coloração das asas de machos (preto) e fêmeas (vermelho). a) Asa anterior, face dorsal; b) Asa anterior, face ventral; c) Asa posterior, face dorsal; d) Asa posterior, face ventral.



**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.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>Anterior dorsal</b>	67,647	26,639
<b>Anterior ventral</b>	60,293	18,462
<b>Posterior dorsal</b>	60,446	22,698
<b>Posterior ventral</b>	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.

<b>Aproximação</b>		<b>Inspeção</b>	
<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>
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
<b>48</b>	<b>17</b>	<b>66</b>	<b>13</b>

**ANEXO 2:**

*Capacidade visual no reconhecimento de parceiros a partir do dimorfismo sexual de coloração em Heliconius ethilla narcaea.*

Etiele de Senna Silveira, André Luis Klein e Aldo Mellender de Araújo.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**CAPACIDADE VISUAL NO RECONHECIMENTO DE PARCEIROS A PARTIR  
DO DIMORFISMO SEXUAL DE COLORAÇÃO EM *HELICONIUS ETHILLA*  
*NARCAEA* (LEPIDOPTERA; NYMPHALIDAE)**

Aluna: Etiele de Senna Silveira

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientador: André Luis Klein

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

Porto Alegre, novembro de 2015.

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



Capacidade visual no reconhecimento de parceiros a partir do dimorfismo sexual de coloração em *Heliconius ethilla narcaea*.

Etiele de Senna Silveira, 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.

Caixa Postal 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone +55 51 3316-7311.

E-mail: [aldo1806@gmail.com](mailto:aldo1806@gmail.com)

E-mail de Etiele de Senna Silveira: [etielesenna@gmail.com](mailto:etielesenna@gmail.com)

## Resumo

Este trabalho visa elucidar se as borboletas *Heliconius ethilla narcaea*, Godart, 1819, são capazes de utilizar a sua capacidade visual para reconhecer parceiros. Foi visto que borboletas possuem uma alta capacidade visual, distinguindo objetos e cores em até 20 metros de distância. Esse projeto foi proposto em consequência de existir uma variação das cores entre os sexos nessas borboletas, sendo que as fêmeas apresentam uma proporção de cor preta maior do que os machos, e os machos apresentam uma menor distância entre a coloração de amarelo e laranja na parte dorsal de suas asas anteriores. Um projeto piloto evidenciou que os machos dessa espécie poderiam utilizar as cores como um mecanismo para diferenciar os sexos e iniciar o cortejo. Foram feitos testes de aproximação e inspeção aos modelos de asas de borboletas em aparato específico para visualizar o comportamento dos machos em relação aos modelos.

Palavras-chave: dimorfismo sexual, capacidade visual, reconhecimento de parceiros, *Heliconius ethilla narcaea*, mimetismo.

## Introdução

Borboletas do gênero *Heliconius* são amplamente distribuídas pela região Neotropical e são usadas em muitos estudos sobre a biologia, ecologia, desenvolvimento, comportamento e genética, como por exemplo em Jiggins e cols. 2015. Heliconíneos são borboletas que permitem esse tipo de trabalho por ter uma diversificação muito recente e possuir muitas espécies que ainda podem produzir híbridos viáveis, possibilitando testes quanto as possíveis características que levam a especiação, e como padrões de mimetismo se diversificaram nesse grupo. A análise e o conhecimento desse grupo ajudam a elucidar muitas questões quanto a especiação, evolução e diferenças ecológicas e desenvolvimento. A primeira tribo teria se originado há 24,8-29,0 Ma e o gênero *Heliconius*, aquele com o maior número de espécies, surgiu a cerca de 10,5-13,4 Ma. (Merril *et.al.*, 2015). Essa diversificação teria tido seu pico durante o período do Mioceno Médio, e a especiação teria iniciado por parapatria e completada em simpatria. Heliconíneos são borboletas com ampla distribuição e muitas sub-espécies com padrões de coloração de alerta evoluíram por mimetismo, seja Batesiano ou Mülleriano. Além disso, possuem um tempo de vida longo para lepidópteros e são bastante fáceis de criar em laboratório. Essas borboletas tem sido objeto de estudo desde a descoberta por Bates em 1862 dos processos miméticos clássicos. Esses motivos permitem que esses organismos sejam modelos para os experimentos em questão (Merril *et.al.*, 2015).

As borboletas que fazem parte desse estudo são as da espécie *Heliconius ethilla narcaea*, (Godart, 1819); possuem coloração de aviso e são impalatáveis, capazes de utilizar os glicosídeos cianogênicos presentes nas folhas das Passifloráceas que servem como alimento durante a fase larval como precursores de compostos eméticos que ajudam na proteção quando adultas (Kronforst, Papa, 2015). Imagens dos indivíduos macho e fêmea se encontram na figura 1.

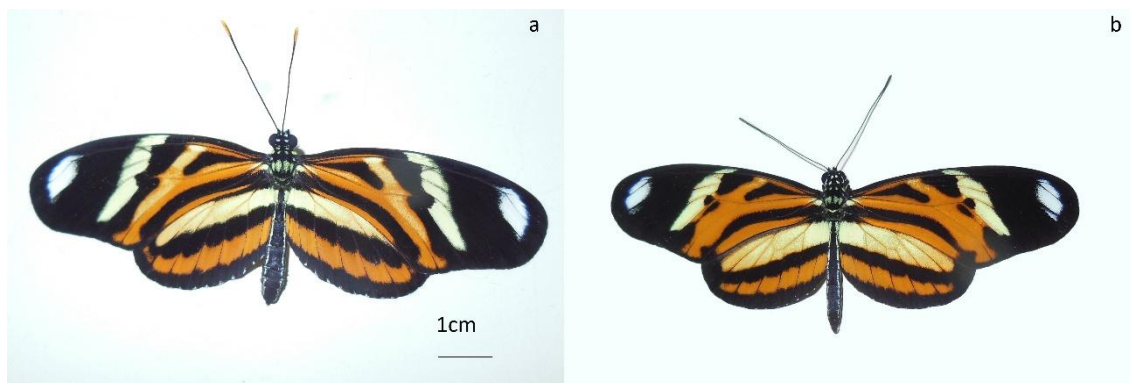


Figura 1- Fêmea (a) e macho (b) de *Heliconius ethilla narcaea*

São encontradas em toda a região sul do Brasil e apresenta o limite da sua distribuição no estado do Rio Grande do Sul. Essas borboletas estão fortemente associadas a diferentes espécies de passifloráceas, que é um grupo de hábitos variados, com 15 espécies do gênero *Passiflora* ocorrendo no Estado, sendo as mais utilizadas por essas borboletas *Passiflora edulis*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora actinia*, *Passiflora misera* e *Passiflora alata*. Esta última foi introduzida no Rio Grande do Sul na década de 1930 e sua expansão parece estar associada com *H. ethilla*. As fêmeas procuram essas espécies para fazer a ovoposição, deixando entre 1 a 4 ovos por gavinhas ou folhas jovens. As larvas eclodem e se alimentam das folhas dessas plantas. Os adultos buscam flores na região para ter o suprimento de pólen e néctar que é necessário para a sua sobrevivência, aumentando a sua longevidade e sua capacidade reprodutiva. Há variação sazonal das populações a qual deve estar ligada as variações de temperatura na região (Silva AK, 2008).

*H. ethilla narcaea* possui uma leve diferença na proporção de cores entre os sexos, com as fêmeas apresentando maiores faixas de preto e menores faixas de amarelo e laranja nas asas anteriores além de possuir uma maior distância entre essas cores, enquanto os machos possuem uma menor distância entre as cores de amarelo e laranja e uma menor proporção de preto - ver Figura 1. Existem pigmentos sensíveis ao ultra-violeta (UV), mas dados anteriores demonstraram que é possível que sejam usados apenas para a distinção entre

espécies e não para distinção intraespecífica (Costa, 2013). Alguns trabalhos evidenciam que borboletas do gênero *Heliconius* possuem uma acuidade visual bastante desenvolvida, sendo capaz de distinguir cores e objetos a 20 metros de distância ou mais (McMillan, Jiggins, Mallet, 1997).

Outros trabalhos já evidenciaram a forma como as borboletas são capazes de se comunicar, utilizando para isso vias visuais, com o auxílio de diferentes pigmentos e padrão de disposição nas asas e uso de feromônios para procurar possíveis parceiros. O uso de compostos químicos pode ter evoluído para auxiliar na distinção entre os mímicos. As cores em borboletas podem servir para diferentes propósitos, tanto para comunicação e reconhecimento intraespecífico, evitar predadores – seja por coloração de alerta ou por padrão críptico ou disruptivo - e para a termorregulação e por isso podem estar sob diferentes tipos de seleções. (Vane-Wright, Boppré, 1993; Klein, Araújo, 2013).

Esse trabalho tenta elucidar se essa pequena diferença dos padrões de cores entre os sexos seria utilizada pelos machos para distinguir entre os sexos apenas utilizando as pistas visuais. Esse leve dimorfismo, aparentemente, não chega a diferencia-las de seus mímicos, e por isso, talvez não sejam utilizados por predadores, mas poderiam ser utilizados para reconhecimento intraespecífico.

## **Material e métodos**

### *Captura e criação de borboletas*

As borboletas foram coletadas na Estação Experimental Agronômica de Águas Belas (FEPAGRO - RS), Viamão (Latitude 30° 2'10.64"S; Longitude 51° 1'17.65"O; Altitude 70 m) e na cidade de São Francisco de Paula, RS, com auxílio de redes entomológicas. Foram levadas ao laboratório, marcadas e depositadas em viveiros de condições seminaturais e com dimensões aproximadas de 2,5X3X3m. As borboletas foram tratadas com misturas de água, mel e pólen que eram oferecidos em alimentadores plásticos que eram renovados diariamente. Os ovos foram coletados nos viveiros com auxílio de pincel, sendo em seguida

depositados em recipientes plásticos dentro de incubadoras tipo B.O.D com controle de fotofase de 12 h luz: 12 h escuro e de temperatura controlada variando de 24-26°C. As lagartas que emergiam foram criadas em conjunto, recebendo folhas de *Passiflora edulis* para a sua alimentação. Adultos quando emergiam foram usados para a produção dos modelos utilizados no experimento.

### *Experimentos comportamentais*

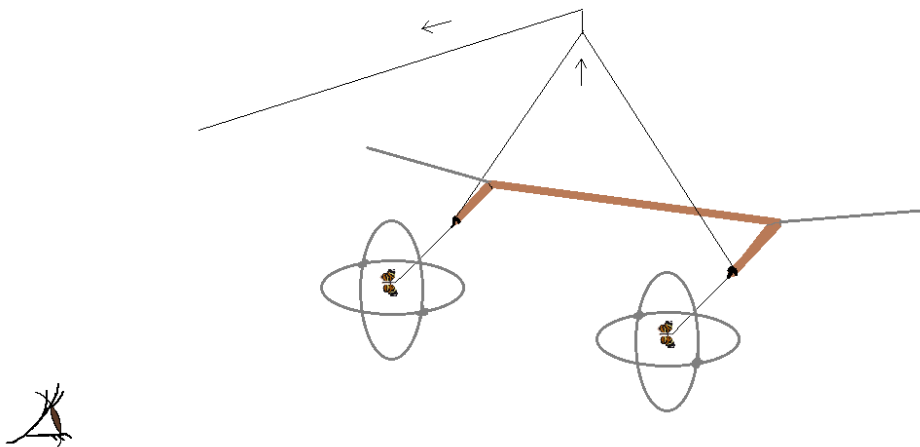
Foi construído modelos de borboletas com hastes plásticas e asas naturais que foram dissecadas de borboletas machos e fêmeas recém emergidos. Essas asas foram tratadas previamente com solvente orgânico hexano para garantir que possíveis compostos voláteis usados para comunicação intraespecífica (feromônios) fossem retirados. As asas foram coladas na haste plástica com papel adesivo e a parte que simula o corpo do animal foi inteiramente pintado de preto com caneta marcadora permanente. Um exemplo dos modelos confeccionados encontra-se na Figura 2 .



**Figura 2- Exemplo dos modelos que foram utilizados nos experimentos comportamentais.**

Esses modelos tinham a possibilidade de serem manipulados e permitiam, quando movimentadas pelo uso de um simples sistema com arames, um movimento similar ao do voo. O sistema encontra-se em um dos viveiros, e é feito de canos de pvc e arames. Existe a delimitação de duas esferas virtuais (representadas por fios de arame perpendiculares) com 50 cm de diâmetro que ficam distantes um metro entre si onde os modelos preparados são postos e apresentados ao grupo de machos capturados. Através de uma linha é possível

manipular os modelos de forma a simular voo. Um esquema geral do aparato pode ser visto na figura 3.



**Figura 3- Esquema do sistema utilizado para os experimentos comportamentais de inspeção e aproximação.**

Este sistema é utilizado internacionalmente para estudos de comportamento de borboletas na escolha de modelos diferentes e está descrito em Jiggins e cols. 2001.

Cada grupo de testes era composto por 3 a 6 machos e o tempo de cada teste foi de 20 minutos. Foram feitas duas repetições por dia, alternando a posição dos modelos no aparato. Houve uma pausa entre os experimentos de no mínimo 20 minutos. As interações dos machos com os modelos foram registradas como: *aproximação*, quando os machos apenas entravam dentro do limite da esfera virtual; *inspeção* quando havia voo sustentado em direção ao modelo e/ou pairavam sobre o modelo. Os dados foram anotados para análise posterior.

Uma outra perspectiva era mimetizar asas de fêmeas, pintando as asas dos machos. Os modelos também foram tratados com hexano, construídos de forma similar ao que já foi descrito. As asas foram provenientes apenas de machos recém emergidos onde foram mantidas as proporções de coloração natural das asas de um deles (foi feita uma intervenção com a tinta guache preta nas áreas que já eram pretas para garantir que os dois modelos tivessem a alteração de tinta nas asas) e o outro teve as asas pintadas com mesma tinta,

aumentando a proporção de preto e a distância entre o amarelo e o laranja, para simular a coloração das fêmeas e averiguar se as proporções desse pigmento nas asas é uma característica importante para a distinção dos sexos entre as borboletas.

### *Espectrofotometria*

Foi feita uma análise da tinta usada nas asas dos machos em cima das diferentes cores em que foi depositada e da cor natural do preto das escamas das asas. O objetivo foi verificar se a reflexão das cores natural e artificial eram as mesmas.

### *Estatísticas*

Para análise dos dados foi utilizada a função de verossimilhança descrita em Jiggins *et al.*, 2001 e Merril *et al.*, 2014 descrita como:

$$\ln(L) = \Sigma [ m_i \ln(P_j) + f_i \ln(1 - P_j) ]$$

Onde  $m_i$  é o número total de aproximações aos modelos de asas de macho,  $f_i$  é o número total de aproximações aos modelos de fêmeas e  $P_j$  é a probabilidade de se aproximar dos modelos feitos com asas de machos. O valor de  $P_j$  foi encontrado com auxílio da ferramenta SOLVER do EXCEL (Microsoft) para maximizar a função  $\ln(L)$ . No segundo momento a mesma equação foi utilizada para os dados de inspeção, onde os valores de  $m_i$  passaram a representar as inspeções feitas aos modelos de machos e  $f_i$  as inspeções feitas aos modelos das fêmeas. Foi feita a razão de verossimilhança considerando que um primeiro modelo em que as probabilidades de aproximação e inspeção dos modelos seriam iguais (modelo nulo), e um segundo modelo em que as probabilidades seriam diferentes, já que  $2\ln(L)$  tem resultado similar a uma curva de qui-quadrado com um grau de liberdade (Sokal, 1995).

## **Resultados**

Os resultados dos testes e as frequências obtidas se encontram na Tabela 1. A aproximação aos modelos com asas de fêmeas (média  $\pm$ DP: 4,76  $\pm$  4,96) e



dos modelos com asas de machos (média  $\pm$  DP: 2,86  $\pm$  2,19) encontram-se na Figura 4. As inspeções dos modelos de asas de fêmeas (média  $\pm$  DP: 7,19  $\pm$  6,69) e dos modelos de asas dos machos (média  $\pm$  DP: 3,52  $\pm$  5,38) estão na Figura 5.

**Tabela 1-** Número total de aproximações e inspeções de machos em relação à modelos de ambos os sexos e frequência relativa média.

<b>Aproximação</b>		<b>Inspeção</b>	
<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>
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
17	9	19	12
3	1	0	0
5	7	1	22
7	6	25	5
2	3	5	9
1	1	2	1
2	1	9	1
2	2	4	0
0	1	0	0
3	4	1	0
6	4	11	6
2	3	1	0

	2	1	7	5
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>151</b>	<b>74</b>
<b>Freq. rel. média</b>	<b>0,625</b>	<b>0,375</b>	<b>0,671</b>	<b>0,328</b>

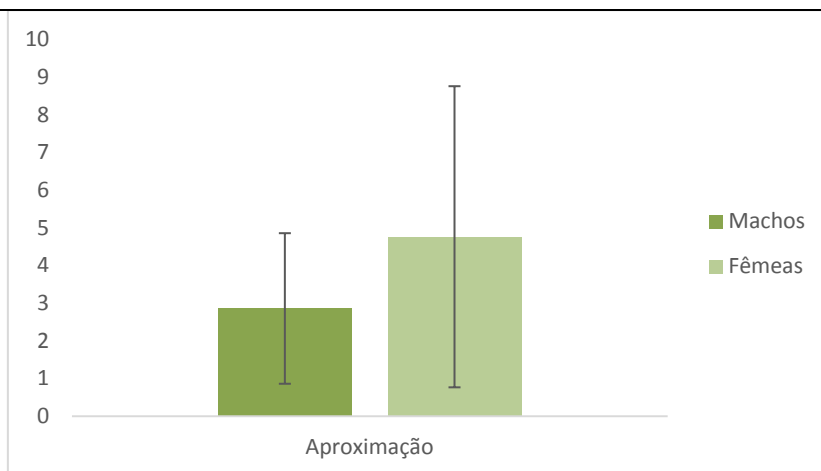


Figura 4- Médias e desvios padrões das aproximações aos modelos de ambos os sexos

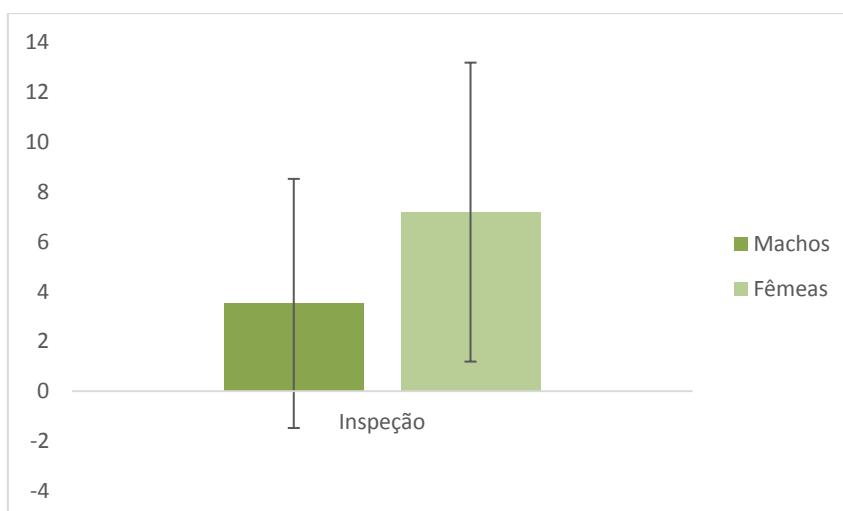
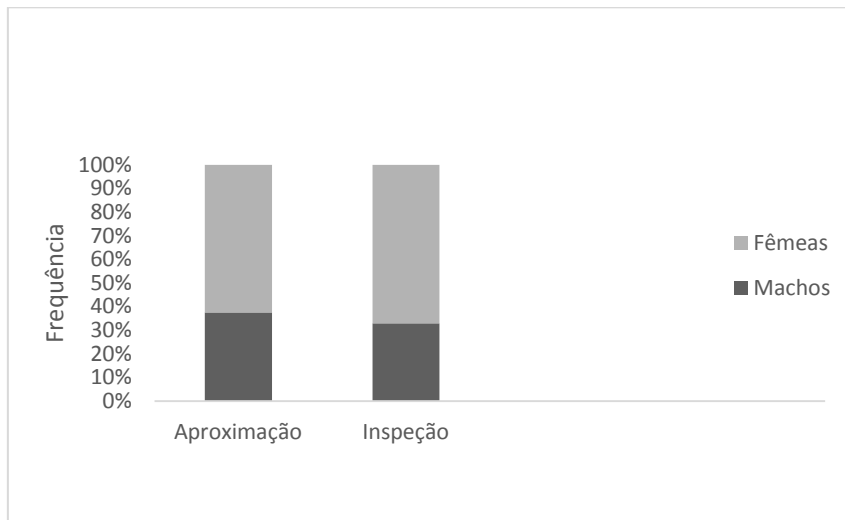


Figura 5- Médias e desvios padrões das inspeções aos modelos de ambos os sexos.

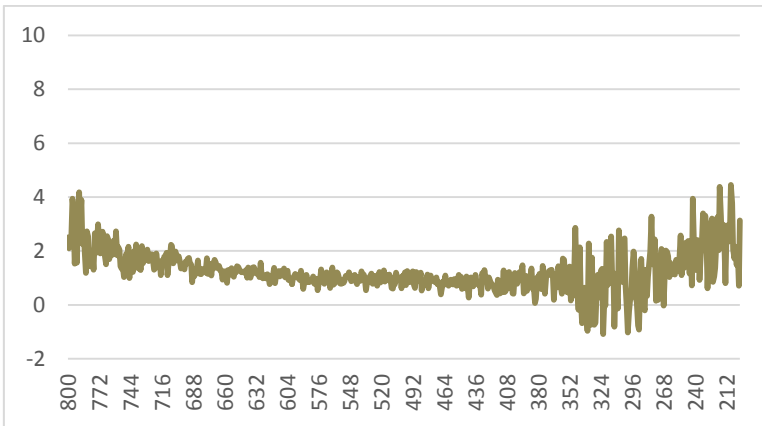
Os resultados calculados através da análise de verossimilhança tiveram diferenças significativas (teste G: 6,32;  $p < 0,05$ ) para aproximação. Isso indica que os machos usam pistas visuais para se aproximarem dos diferentes modelos. Da

mesma forma, os resultados para inspeção mostraram diferenças estatísticas (teste G: 11,95;  $p < 0,001$ ), mostrando que os machos inspecionam com maior afinco os modelos feitos a partir das asas naturais das fêmeas. As frequências de aproximação e inspeção encontram-se na figura 6.

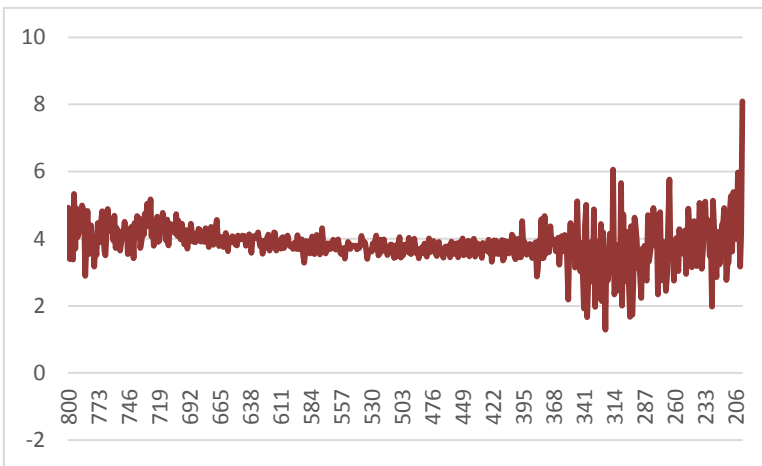


**Figura 6- Frequências calculadas de inspeção e aproximação aos modelos de ambos os sexos.**

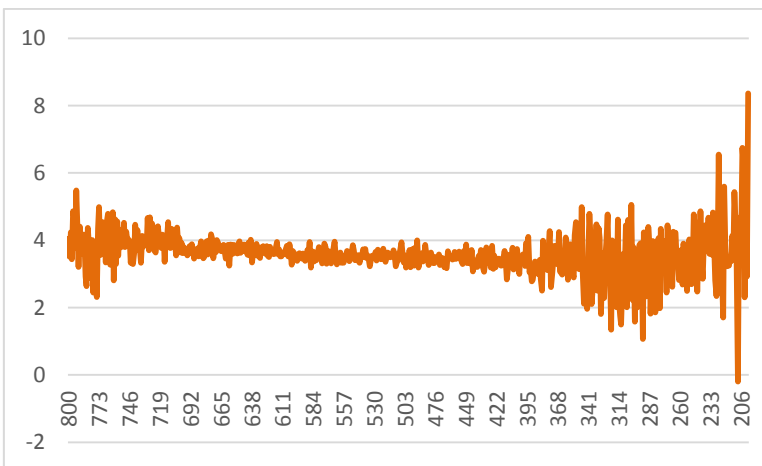
Os resultados dos testes com a modificação pela tinta nas asas sobre diferentes cores de escamas (sobre as escamas pretas, amarelas e laranjas) mostraram grande diferença na espectrofotometria entre a tinta guache preta e o preto natural das asas. Não houve grandes diferenças entre as tintas depositadas sobre as diferentes cores de escamas. As reflectâncias obtidas nas análises por espectrofotometria das asas naturais e da tinta guache preta sobre diferentes cores de escamas estão nas Figuras 7-10.



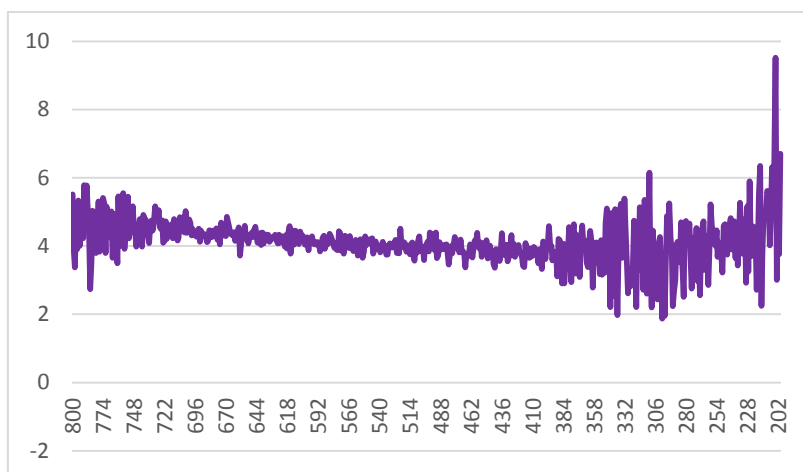
**Figura 7- Espectrofotometria do preto natural das asas.**



**Figura 8- Espectrofotometria da tinta preta sobre as escamas laranjas.**



**Figura 9- Espectrofotometria da tinta preta sobre as escamas amarelas.**

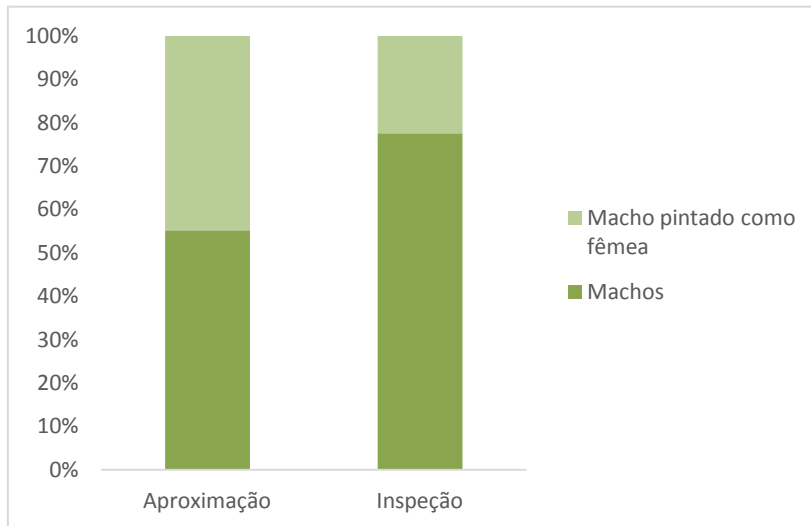


**Figura 10- Espectrofotometria da tinta preta sobre as escamas pretas.**

Os resultados desses experimentos com os modelos das asas de macho naturais e com os modelos com asas com a intervenção da tinta constam na Tabela 2. As frequências obtidas a partir desses dados estão representadas na Figura 11.

**Tabela 2.** Dados testes com asas pintadas, sendo as últimas linhas o somatório dos valores brutos encontrados e frequência média.

	<b>Aproximação</b>		<b>Inspeção</b>	
	<b>Machos</b>	<b>Machos asas pintadas</b>	<b>Machos</b>	<b>Machos asas pintadas</b>
	2	2	16	2
	1	3	9	5
	13	8	13	4
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>38</b>	<b>11</b>
<b>Freq. rel. média</b>	<b>0,551</b>	<b>0,448</b>	<b>0,775</b>	<b>0,224</b>



**Figura 11- Frequências obtidas dos testes do projeto piloto com as asas de machos pintadas.**

## Discussão

Diferenças na busca do acasalamento podem auxiliar os indivíduos a se identificarem, evitando que venham a se aproximar de outras espécies, funcionando como uma barreira reprodutiva. Logo, esses processos funcionam como mecanismo de isolamento reprodutivo e são muito importantes principalmente nessas espécies que fazem parte de anéis miméticos. O gênero *Heliconius* possui uma alta diversidade de cores brilhantes e de alerta, sendo ótimos objetos de estudo para testar o que leva ao isolamento reprodutivo (Merril, Chia, & Nadeau, 2014). Para que inicie o cortejo é necessário a habilidade de distinguir entre os possíveis parceiros e para isso fazem o uso dos seus sistemas sensoriais sendo possível que as características olfatórias e visuais sejam usadas para esse reconhecimento. Muitas espécies mostram o comportamento dos machos de patrulha em busca de fêmeas e outros recursos, portanto, os machos são mais ativos. A visão nesses processos pode estar associada a características como movimento, tamanho e cores. Nos comportamentos de corte pistas químicas e acústicas podem estar envolvidas no processo de reconhecimento,

mas o reconhecimento visual serve como gatilho para estimular uma aproximação e está envolvida nas primeiras etapas da busca pelo parceiro que, se houver sucesso, poderá levar ao acasalamento (Scott, 1973).

Os heliconíneos são altamente visuais e usam pistas para achar localizações de fontes de recursos e possíveis parceiros. A utilização dessas pistas permite aos organismos diferenciarem outros indivíduos, dando-lhes uma vantagem no momento de reprodução. Como visto anteriormente, a sinalização por meio de cores pode ter como função a termorregulação, coloração de alerta e reconhecimento de parceiros juntamente com os meios químicos necessários (feromônios). O naturalista Henry Walter Bates descobriu o mimetismo como fenômeno evolucionário em que a seleção por predadores visualmente orientados causa a semelhança entre espécies não relacionadas, estando a aparência externa ligada a sobrevivência e reprodução. Muitas borboletas adquirem coloração semelhante que permite que os predadores aprendam a evitar esse padrão de alerta, formando então os anéis miméticos. O mimetismo Batesiano é responsável pelo mesmo padrão de cores entre organismos palatáveis que imitam a coloração de um organismo impalatável ou com algum outro mecanismo ativo de defesa, como ferrão, por exemplo. O mimetismo Mülleriano se dá quando duas espécies diferentes, ambas impalatáveis, convergem para mesmo padrão de cor de alerta que permite aos predadores evitarem a ambos<sup>1</sup>. No caso dessas borboletas, elas utilizam os compostos cianogênicos das plantas hospedeiras para a produção de glicosídeos alifáticos que garantem a sua sobrevivência na vida adulta (Kronforst & Papa, 2015).

A impalatabilidade parece ter evoluído por seleção de parentesco (Benson, 1971), embora a seleção individual possa estar envolvida. As características das espécies impalatáveis podem variar, sendo que o tamanho e a robustez do organismo, a dureza e resiliência do tegumento, a habilidade de exsudar fluidos

---

<sup>1</sup> Nota: No presente trabalho mantivemos a clássica distinção entre mimetismo Batesiano e Mülleriano, em vez de utilizar o sistema geral proposto por Vane-Wright, 1976.

corpóreos nocivos, ou mesmo a incorporação de agentes impalatáveis no adulto podem dificultar que ele seja predado (Benson, 1971). A acuidade visual dessas borboletas além de permitir que elas reconheçam os sexos, pode ser usada pelos machos para evitarem cortejar a espécie errada pertencente ao mesmo anel mimético. Sistemas nervosos com grandes porções nas áreas de aprendizado, visual e olfatório nesse gênero parecem contribuir para o processamento das informações e comportamentos desses animais (Merril *et.al.*, 2015). Para diferenciar entre indivíduos de espécies diferentes é possível que eles utilizem os comprimentos de onda em UV. A discriminação através das pistas visuais leva a vantagens para ambos os sexos, já que o macho não perderia tempo cortejando um indivíduo do mesmo sexo.

No presente trabalho, os testes foram feitos com machos já que eles procuram ativamente locais com recursos alimentares e parceiras. A retirada de possíveis compostos voláteis no tratamento das asas dos modelos permitiu uma análise do comportamento dos machos em relação aos modelos utilizando apenas as pistas visuais como gatilho para aproximação e inspeção. Uma maior inspeção nos modelos de asas de fêmeas recém emergidas (com  $p < 0,001$ ) indica que um processo de corte poderia ser iniciado se houvesse outras pistas, como químicas por exemplo. As diferenças que ocorreram entre as colorações das asas de machos e fêmeas parecem ser muito pequenas para serem utilizadas pelos predadores. Logo elas não estariam sofrendo seleção natural para diferir do padrão do macho, e o que nos fez acreditar que essas pequenas diferenças poderiam ser resultado de seleção sexual para avaliar à distância o sexo da borboleta.

Os resultados corroboram essa hipótese que já havia sido levantada anteriormente em outro projeto, que havia encontrado diferenças significativas das colorações das asas dos machos, em que essas diferenças poderiam ser utilizadas para a discriminação entre os diferentes sexos (Costa, 2013). É possível que essas diferenças tenham surgido por causa dos comportamentos distintos entre os sexos, sendo os machos o sexo mais ativo na procura de parceiras. As fêmeas teriam essa vantagem na termorregulação devido a maior



presença de preto em suas asas. É provável que o requerimento térmico para cada um dos sexos seja diferenciado, já que estes possuem hábitos diferentes. Menor quantidade de preto nas asas dos machos pode servir como sinal honesto de qualidade genética, já que acarreta ao indivíduo um custo termal. Mas a termorregulação sozinha não poderia explicar esse dimorfismo encontrado.

Os dados atuais indicam que os machos de *H. ethilla* se aproximam e inspecionam com maiores frequências aqueles modelos que são provenientes das asas de fêmeas recém emergidas. Isso indica que eles utilizam sua grande capacidade visual para fazer as diferenciações entre os sexos e decidir sobre as suas aproximações e inspeções, já que as substâncias químicas voláteis foram retiradas quando as asas foram tratadas com solvente orgânico evitando o uso de outro sistema de percepção de indivíduos como variável nesse projeto. É possível que essa capacidade de diferenciar seja adaptativa, já que existe a vantagem de evitar desperdício de tempo e energia em cortejar um indivíduo de mesmo sexo (Klein e Araújo, 2013).

A partir desses resultados podemos imaginar outros experimentos que possam complementar esses estudos de forma que possamos entender melhor como essas buscas complexas podem ser iniciadas por esses organismos. Não foi visto comportamentos de continuidade do processo de corte, indicando que outros componentes - como químicos voláteis - sejam necessários para que a corte continue. Isso indica que os processos de corte podem ser bastante complexos e levam em consideração muitas variáveis – pistas visuais e olfatórias, receptividade do outro sexo- para que o comportamento se manifeste.

Um outro teste importante, que poderia ser feito, seria averiguar se é a proporção de preto nas asas das fêmeas que funciona como um gatilho para a inspeção e aproximação. Para isso é necessário manipular as asas naturais de machos com tinta, de modo a simular as asas das fêmeas e fazer um controle da presença da pintura nas asas dos machos – pintando de preto áreas dessa cor e que estivessem próximas as regiões que foram mais pintadas nas fêmeas- e analisar como os adultos reagem a essa modificação. Foi feita tentativa para esses testes, com a construção dos modelos a partir das asas de machos, mas os

resultados das reflectâncias da tinta e das asas dos modelos naturais diferiram bastante, sendo necessário modificar a reflectância da tinta com misturas para minimizar as diferenças entre as cores artificiais e naturais (Silva, 2015). É provável que as reflectâncias da tinta e da asa natural, tenha sido a razão pela qual ocorreu essa variação de resposta comportamental em relação aos modelos do experimento, (frequência de aproximação aos modelos de machos de 55,17%; 44,83% de aproximações em modelos que simulam a coloração das fêmeas) sendo o mais notável o maior número de inspeções no modelo de asas do macho (frequência obtida de 77,55% de inspeções em modelos de machos; 22,45% de inspeções no modelo que simula a coloração das fêmeas). O modelo das asas de macho tinha pouca quantidade de tinta nas suas asas - apenas para atuar como um controle entre presença e ausência da tinta nos modelos - e é provável que eles tenham reconhecido as maiores modificações nos modelos que simulavam as cores da fêmea. Como pode ser visto nas Figuras 7 - 10 os picos de reflectância diferem muito das cores naturais. Também por causa da sequência de dias chuvosos essa parte do trabalho não foi finalizada, já que não foi possível continuar com os testes nos viveiros e as coletas desses animais se tornou bastante prejudicada, deixando essa questão em aberto. Uma outra forma de analisar o que leva à discriminação entre os sexos apenas pelas pistas visuais seria ver se existe variação dos padrões sob luz polarizada nas asas, mas esse foi um experimento que ainda não foi feito. Um outro ponto que deveria ter sido abordado seria a questão de preferências individuais para os tipos diferentes de coloração.

Pesquisas para entender o comportamento de corte e preferências são essenciais para solucionar as questões acerca das diferentes intensidades de seleção que essas populações estão sofrendo durante seu processo evolutivo. Diferenças comportamentais podem estar associadas a mudança de frequência de diferentes fenótipos em uma população. Outros traços podem estar sofrendo diferentes pressões seletivas o que evita que eles fujam do padrão a que já pertencem. Uma dessas possibilidades é que o dimorfismo nessa espécie, talvez não seja tão acentuado quanto nos casos de dimorfismos sexual em mímicos Batesianos de outras espécies de borboletas, talvez porque haja uma pressão

dos predadores sobre os padrões impedindo que venham a diferir muito de seus mímicos. Mais estudos sobre essas questões são necessários.

## **Agradecimentos**

Somos gratos a todos os integrantes do Laboratório de Genética Ecológica que auxiliaram na criação das borboletas utilizadas e permitiram que o projeto acontecesse: Janaína De Nardin, Rosana Huff, Pietro Pollo, Natasha Nonemacher Magni e Thiana Arisi. Ao Marcelo Pereira do Laboratório de Laser e Ótica do Instituto de Física da UFRGS, pelas análises de espectrofotometria. E a Sídia M. Jacques-Callegari pelo auxílio nas análises estatísticas.

## **Bibliografia**

Benson WW (1971) Evidence for the evolution of unpalatability through kin selection in the Heliconinae (Lepidoptera). *The American Naturalist*, 105(943): 213-226

Costa MC (2013) Dimorfismo sexual e reconhecimento de parceiros em *Heliconius ethilla narcaea* (Lepidoptera, Nymphalidae). Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, UFRGS.

Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL & Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*.411:302-305

Klein AL (2011) 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. *Neotrop. Entomol.* 42: 600-606

Kronforst MR & Papa R (2015) The functional basis of wing patterning in *Heliconius* butterflies: the molecules behind mimicry. *Genetics*. 200:1-19

McMillan WO, Jiggins CD, Mallet J (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 8628-8633

Merril RM, Chia A & Nadeau NJ (2014) Divergent warning patterns contribute to assortative mating between incipient *Heliconius* species. Ecology and Evolution. 4(7):911-917

Merril RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak MK, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RWR & Yu Q (2015) The diversification of *Heliconius* butterflies: what have we need learned in 150 years? Journal of Evolutionary Biology. doi: 10.1111/jeb.12672

Scott JA (1973) Mating of Butterflies. Journal of Research on the Lepidoptera. 11(2): 99-127

Silva AO (2015) Pistas visuais no reconhecimento intra e interespecífico em duas espécies de borboletas miméticas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Silva AK (2008) Interação de *Heliconius ethilla narcaea*, Godart (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) com Passifloráceas ocorrentes no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles of statistics in biological research. 3ª edição. San Francisco: W. H. Freeman

Vane-Wright, RI (1976). A unified classification of mimetic resemblances. Biol. J. Linnean Society 8: 25 – 56.

Vane-Wright RI, Boppré M (1993) Visual and chemical signaling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. Phil. Trans. R. Soc. B. 340: 197-205