



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

**PISTAS VISUAIS NO RECONHECIMENTO INTRA
E INTERESPECÍFICO EM DUAS BORBOLETAS
MIMÉTICAS IMPALATÁVEIS**

Dissertação de Mestrado

ANANDA DE OLIVEIRA DA SILVA

Orientação
Márcio Zikán Cardoso

Natal
2015

ANANDA DE OLIVEIRA DA SILVA

**PISTAS VISUAIS NO RECONHECIMENTO INTRA
E INTERESPECÍFICO EM DUAS BORBOLETAS
MIMÉTICAS IMPALATÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ecologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zikán Cardoso

Natal
2015

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Silva, Ananda de Oliveira da.

Pistas visuais no reconhecimento intra e interespecífico em duas borboletas miméticas impalatáveis / Ananda de Oliveira da Silva. – Natal, RN, 2015.

35 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zikán Cardoso.

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

1. Borboletas (Heliconius). – Dissertação. 2. Reconhecimento de espécie. – Dissertação. 3. Variação sutil. – Dissertação. I. Cardoso, Márcio Zikán. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB
595.78

CDU

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Márcio Zikán, por proporcionar a oportunidade de um trabalho prazeroso. Pelo apoio, dedicação e parceria.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Vanessa Moraes, Giesta Khrisna e Leonardo Machado, sem o qual o auxílio dos mesmos este trabalho não seria executado.

Ao José Elieudo Dias Barbosa pela construção do viveiro.

Ao professor Daniel Pessoa, pela sempre solicitude no auxílio fornecido pelas análises do tipo de papel e tintas utilizadas nos modelos.

Ao Vitor Gurgel e a Kionara Sarabela pelo apoio do laboratório e pela amizade.

À CAPES pelo imprescindível apoio financeiro.

À Susan Finkbeiner pelo esclarecimento e a indicação do usos das tintas UV.

Aos professores do PPG Ecologia e a minha turma da pós-graduação, sem os quais o aprendizado não seria tão valioso.

À minha amiga Elenize Trindade e a sua família por fornecer o afago familiar desde o primeiro dia em que cheguei à Natal, pela amizade e companheirismo.

À minha mãe Leila por me encorajar e fornecer apoio ao desafio.

Aos meus amáveis irmãos Isaac e Matheus e a minha tia Sy pelo amor incondicional.

Ao meu pai Máximo que, mesmo na ausência material, tornou-se presente em minha companhia todos os dias.

À minha família potiguar Érika, Thalita, Gustavo e Lívia pelo convívio amoroso.

Aos inúmeros amigos que fiz e que me acolheram nessa cidade calorosa, em especial à Larissa, Isabela e Petruquio.

As amigas que moram longe Isadora, Denise, Solange e Bruna pela torcida.

À família.

Ao Leo e ao Marcelo, pelo início de tudo.

Enfim, as borboletas, tão preciosas, curiosas e fascinantes aos nossos olhos.

Resumo

Duas espécies de borboletas miméticas *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene* apresentam coloração similar. Tal similaridade pode atuar confundindo o reconhecimento de seus co-específicos no momento da escolha de parceiros sexuais. As duas espécies possuem um conjunto de variações sutis na cor de suas asas que são compartilhadas por ambas espécies, como os pontos vermelhos encontrados acima da faixa amarela. Em *H. erato* variações na cor de suas asas são exclusivas da espécie como os *red raylets* e pontos amarelos na região distal da asa posterior. Acredita-se que tais variações fenotípicas auxiliem no reconhecimento de seus co-específicos, para tanto, o presente estudo tem por intuito verificar se as duas espécies envolvidas na análise reconhecem seus co-específicos. Experimentos com modelos que contemplaram variações sutis foram montados e apresentados aos machos de *H. erato* e *H. melpomene*. Em cada experimento foi verificado a probabilidade relativa de aproximação do macho ao modelo. O teste de *likelihood* indicou que as diferenças sutis encontradas nos padrões de asas de *H. erato* e *H. melpomene* podem atuar como pistas de reconhecimento de indivíduos da mesma espécie. Sendo que a espécie *H. erato* pode ser considerada um discriminador mais refinado no reconhecimento, e ambas as espécies selecionaram modelos que possuem variações médias, indicando seleção normalizadora para a escolha do padrão de asa. Podemos concluir, que a cor e, principalmente, os padrões sutis na variação da cor são utilizados como um sinal usado por borboletas no reconhecimento de seus co-específicos.

Palavras-chave: *Heliconius*, cor de asa, reconhecimento de espécies, variação sutil

SUMÁRIO

Introdução.....	7
Objetivo Geral	9
Objetivos Específicos	9
Material e Métodos.....	10
Criação de borboletas.....	10
Modelos artificiais	10
Teste de probabilidade.....	10
Resultados.....	16
<i>Heliconius erato</i>	16
<i>H. melpomene</i>	19
Discussão.....	22
Referências bibliográficas	25

Introdução

A grande diversidade de espécies de borboletas resulta em inúmeros padrões de comportamento, exploração de recursos, movimento e variações em forma e cor. Suas asas, estruturas corporais que dão nome ao grupo Lepidoptera, palavra de origem grega que significa asa revestida por escamas, são estruturas que determinam uma das principais características do grupo. As asas das borboletas não somente proporcionaram adaptações para o voo, mas com suas variações em formas e cor, desempenham papéis comportamentais e ecológicos (Scott, 1986).

Entre os aspectos funcionais das asas das borboletas pode-se citar o seu papel na termorregulação, por meio da exposição destas à radiação solar (Kingsolver, 1985). A coloração das asas também está associada aos mecanismos de defesa contra predadores por meio de cores aposemáticas, que funcionam na sinalização entre presas e potenciais predadores (Brown, 1981), ou ainda através de cores e padrões crípticos, que mesclam a borboleta com o ambiente ao seu redor. Adicionalmente, a cor das asas de borboletas pode também estar relacionada a comunicação intraespecífica, via seleção sexual e localização de parceiros para o acasalamento (Vane-Wright & Boppré, 1993).

Como exemplo da demonstração dos aspectos funcionais das asas de borboletas, podemos citar as espécies do gênero *Heliconius*, as quais são amplamente reconhecidas por sua coloração conspícua e impalatabilidade (Brown, 1981; Turner, 1981). Além de sinalizar sua impalatabilidade aos predadores, a cor das asas em *Heliconius* também pode ser usada como pista visual por machos e fêmeas no processo de identificação do parceiro apropriado para o acasalamento (Jiggins *et al.*, 2001).

Neste contexto, diversos trabalhos já reconheceram a importância da cor para o reconhecimento de parceiros sexuais (McMillan *et al.*, 1997; Jiggins *et al.*, 2001; Kronforst, 2006a,b; Estrada & Jiggins, 2008). O uso da cor e/ou padrão da asa na seleção de parceiros sexuais é uma das principais barreiras à formação de híbridos. Um dos principais mecanismos dos processos de especiação é o isolamento reprodutivo e os padrões de cores das asas em borboletas desempenham um papel significativo de divergência inicial das espécies (McMillan *et al.*, 1997). Por outro lado, a similaridade visual entre espécies miméticas pode vir a causar confusão no reconhecimento intra e inter-específico. Em um estudo realizado com subespécies de *Heliconius melpomene* e *H. erato*, observou-se que machos foram atraídos por fêmeas de ambas espécies através de pistas visuais. No entanto, cortes prolongadas e tentativas de cópulas foram raras em

indivíduos co-mímicos, sugerindo, deste modo, a existência de estímulos específicos de reconhecimento de sua própria espécie (Estrada & Jiggins 2008).

Heliconius erato e *Heliconius melpomene* são duas espécies de borboletas miméticas neotropicais que formam pares miméticos virtualmente idênticos em aparência e comportamento (Hines *et al.*, 2011). Devido à semelhança na coloração de suas asas, este aspecto pode interferir no reconhecimento em ambas as espécies, sugerindo que estímulos específicos facilitam o reconhecimento de parceiros sexuais (Estrada & Jiggins 2008).

Na região leste do Brasil, as duas espécies apresentam asas com fundo preto e faixas vermelhas nas asas anteriores (Figura 1). As asas posteriores também são pretas e possuem uma banda amarela, com um conjunto de pontos vermelhos acima da mesma. Exclusiva da espécie *Heliconius erato*, pequenas barras vermelhas, denominadas *red raylets*, são encontradas na parte inferior das asas posteriores, logo abaixo da faixa amarela. Além dos *red raylets*, *H. erato* conta também com um conjunto de manchas amarelas na parte distal da asa posterior denominadas de retângulo creme.



Figura 1. Características fenotípicas das espécies (A) *Heliconius erato*, com os *red raylets* abaixo da faixa amarela e os pontos vermelhos na região superior da banda amarela, e retângulo creme na parte distal das asas posteriores; e em (B) *Heliconius melpomene*, com a presença de manchas superiores e ausência dos *red raylets* e do retângulo creme na região distal da asa posterior. Fotos: Ananda Silva.

Os *red raylets* foram inicialmente assim denominados por Emsley (1965) (*apud* Ramos & Freitas 1999) e variam entre indivíduos e estação, representando um caso de polimorfismo genético (Pansera & Araújo 1983). Especula-se que a variação na frequência destes elementos ocorre em resposta a sazonalidade (Oliveira & Araújo 1992; Ramos & Freitas, 1999; Lima, 2009). Emsley (1965) sugere que as variações nos *red raylets* podem ter importância na corte e atuarem como um mecanismo de

reconhecimento. No entanto, os estudos disponíveis são principalmente descritivos (Pansera & Araújo, 1983; Ramos & Freitas, 1999) e não exploram os aspectos funcionais e/ou adaptativos desta variação. Dados preliminares em populações naturais sugerem que a frequência de machas vermelhas nas asa anteriores das duas espécies não são similares e que o coeficiente de variação nas machas inferiores é maior que o das manchas superiores em *H. erato* (M. Cardoso, dados não publicados).

Partindo da idéia que *H. erato* e *H. melpomene* necessitam de estímulos específicos para o reconhecimento de seus co-específicos (Estrada & Jiggins, 2008), uma vez que as mesmas estão no mesmo habitat e compartilham da mesma estratégia adaptativa de proteção contra predadores, o mimetismo, sugere-se que os *red raylets* e as manchas vermelhas das asas posterior de *H. erato* e *H. melpomene* possam ser utilizados como sinais de reconhecimento de espécies. Sendo assim, a hipótese é que variações discretas de coloração em duas espécies de borboletas miméticas impalatáveis auxiliam no reconhecimento de parceiros sexuais da mesma espécie, sanando a confusão efetivada por espécies que possuem o mesmo padrão de coloração.

Objetivo Geral

No intuito de testar a hipótese citada, o presente estudo teve por objetivo testar se diferenças sutis em padrões de cor e suas variações em duas espécies miméticas, *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene*, são utilizados como pistas no reconhecimento entre as espécies. Para tanto, machos adultos foram confrontados com asas artificiais que simularam variações fenotípicas nas asas de suas potenciais parceiras.

Objetivos Específicos

1. Identificar se machos de *Heliconius erato* e *H. melpomene* discriminam modelos com padrões de *H. erato* e *H. melpomene*.
2. Verificar o uso de pistas fornecidas pela frequência de *red raylets* pelos machos de *Heliconius erato*.
3. Verificar se machos de *H. melpomene* reconhecem variações no número de manchas superiores vermelhas.

Material e Métodos

Criação de borboletas

Os experimentos foram realizados com indivíduos adultos de *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene*, obtidos a partir de ovos de fêmeas capturadas em um remanescente florestal próximo à cidade de Natal (5°56' S 35° 11' W). As larvas foram criadas em laboratório e mantidas em recipientes de plástico em condições de temperatura e umidade ambiente, alimentadas com folhas de *Passiflora cincinnata* e *Passiflora galbana* suas plantas hospedeiras, respectivamente. Ao emergir, os adultos foram transferidos para um viveiro ao ar livre (10 x 5 m) e alimentados com solução de aminoácidos e açúcar; esporadicamente foram ofertadas flores de *Lantana camara*.

Modelos artificiais

Os modelos de asas artificiais usados nos experimentos de reconhecimento foram montados a partir de fotos digitais de asas reais. Para tanto, as fotos foram tratadas e modificadas no programa *Adobe Photoshop*, e impressas em papel filtro de gramatura 80, dado sua capacidade de refletância natural (Susan Finkbeiner, comunicação pessoal). Posteriormente, as asas artificiais foram recortadas e coladas em uma estrutura de massa de modelar que simulava o corpo de uma borboleta. Por fim, os modelos artificiais foram inseridos em uma estrutura de arame, possibilitando flexibilidade aos mesmos.

A faixa amarela das asas de *Heliconius* reflete luz ultravioleta (Briscoe *et al.*, 2009). Para recriar este efeito, a porção amarela dos modelos de asas artificiais foi pintada com tintas especiais. Para tanto, foram usadas as tintas UV *Lure Paint* (Amarelo), UV *Lure Paint* (Preto) e pequenas quantidades de tinta branca guache Acrilex.

Para garantir que as asas artificiais apresentassem características de reflexão de luz similares às asas naturais, foram medidas as refletâncias das asas naturais e comparadas aos modelos das asas artificiais (Anexo 1). As mensurações foram medidas no mesmo dia nas mesmas condições de luminosidade e obtidas a partir de um sistema de espectrometria da OceanOptics Inc. (USB4000-UV-VIS) acoplado a um computador com o programa SpectraSuite.

De forma a verificar se as borboletas poderiam reconhecer os estímulos apresentados pelas asas artificiais, foram feitas simulações correlacionando os espectros de refletância das asas artificiais e dados referentes à sensibilidade espectral de *Heliconius*, obtidos em Swihart (1971) e Briscoe *et al.* (2010) (Figura 2). Para esta determinação, foram calculadas as capturas quânticas das asas artificiais que possibilitaram determinar o contraste cromático em JND (*Just Noticeable Difference*). Estudos prévios indicam que valores de $JND > 1$ sugerem que as borboletas sejam capazes de discriminar as cores usadas nos modelos (Tabela 1) (Briscoe *et al.*, 2009, Finkbeiner *et al.*, 2012). As simulações foram feitas no programa R, utilizando o pacote Pavo (Maia *et al.*, 2013).

Tabela 1. Contraste cromático em JND (*Just Noticeable Difference*), para todas as cores usadas nas asas artificiais de *Heliconius*, com base nos picos de sensibilidade espectral de *Heliconius*, onde M1 = modelo 1; M2 = modelo 2; M3 = modelo 3; M4 = modelo 4; M5 = modelo 5 e M6= modelo 6.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Preto	1,428	1,4023	1,3138	1,2991	1,3693	3,1283
Vermelho	1,0247	0,9563	0,8041	0,9983	0,6773	0,6773
Amarelo	2,5781	1,9057	2,8787	2,2451	2,1159	1,7253

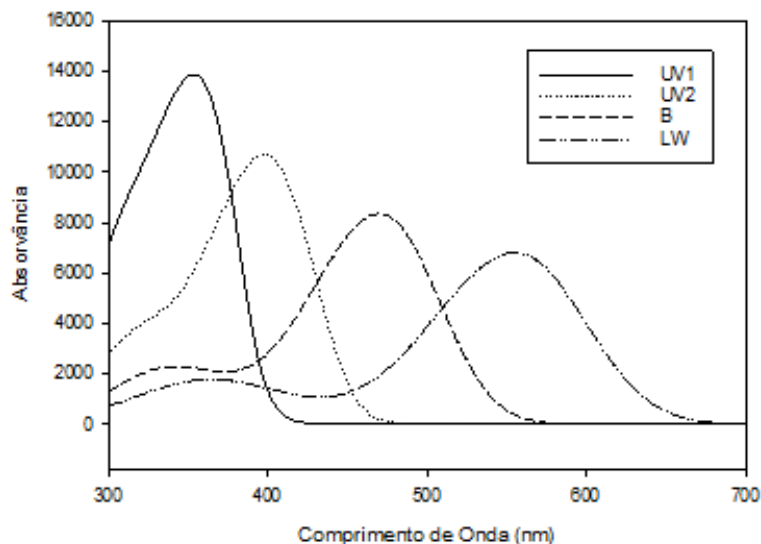


Figura 2: Curvas de sensibilidade espectral de *Heliconius*.

Experimentos

Em nossos experimentos foram observadas as respostas de machos submetidos ao encontro com modelos de borboletas. O uso das respostas dos machos foi determinado pelo protagonismo destes em iniciar a corte e, conseqüentemente, do papel inicial do reconhecimento. Em *Heliconius* a corte é normalmente iniciada pelos machos durante voos seguidos por inspeção das fêmeas em pouso (Klein & Araújo, 2010).

Os ensaios experimentais foram realizados em um viveiro com dimensões de 2,1 x 1,75 m e 1,8 m de altura. O procedimento experimental foi iniciado a partir da fixação do modelo artificial em um arame localizado em uma parede do viveiro. Durante cada ensaio, foram mantidos entre 4 e 7 machos no viveiro. O número de machos em cada ensaio dependeu da quantidade de animais disponíveis no viveiro. Um mesmo macho pôde participar de mais de um teste. Os machos não tiveram acesso a fêmeas vivas e os experimentos ocorreram sempre no período da manhã.

Cada ensaio consistiu na apresentação de um modelo com o padrão de asa real (controle), durante vinte minutos, seguido pela apresentação de um modelo experimental, também durante vinte minutos. Foi usado um intervalo de dez minutos entre a apresentação dos dois modelos. A ordem de apresentação do tipo de modelo foi aleatorizada em cada ensaio. Estabelecemos o número de dez réplicas em cada ensaio. Um único observador contabilizava o número de aproximações que os machos tinham diante de cada modelo. A aproximação ao modelo foi determinada quando o macho voava em direção ao mesmo.

Ao todo, foram realizados experimentos (diagramatizados nas figuras 3 a 8), explorando as conseqüências da variação do padrão de cor no comportamento dos machos.

Experimento I: Machos de *Heliconius erato* preferem fêmeas de sua própria espécie?

O primeiro experimento (Figura 3) testou se machos de *Heliconius erato* preferem fêmeas de sua própria espécie ou fêmeas de *H. melpomene*.



Figura 3. Diagrama representando o desenho experimental para o teste do reconhecimento por machos de *Heliconius erato* (Experimento 1). As imagens representam região ventral das asas artificiais geradas para os experimentos. Aos machos de *Heliconius erato* foram apresentados fêmea-modelo de *H. erato* (Modelo1) e *H. melpomene* (Modelo 2).

Experimento 2: Machos de *Heliconius erato* escolhem fêmeas usando pistas presentes nos sinais polimórficos (variação quantitativa em *red raylets*)?

Este experimento testou se a escolha dos machos de *H. erato* é influenciada pelo número de elementos de *red raylets* nas asas das fêmeas. Para tanto, machos foram apresentados a modelos com valores extremos no número de elementos dos *red raylets*. O modelo mínimo apresentou apenas um elemento de *red raylet* (Figura 4), ao passo que o modelo máximo apresentou uma asa com 9 elementos de *red raylets* (Figura 5). A média de *red raylets* em populações naturais é de 5 elementos.



Figura 4. Diagrama representando o experimento 2 para o teste de reconhecimento dos extremos de variação dos *red raylets*. Imagem da região ventral das asas anterior e posterior. Aos machos de *H. erato* foram apresentados o modelo padrão de *H. erato* e um modelo-fêmea com 1 *red raylets* (Modelo 3).



Figura 5. Diagrama representando o desenho experimental para o teste de reconhecimento dos extremos de variação dos *red raylets*. Imagem da região ventral das asas anterior e posterior. Aos machos de *H. erato* foram apresentados o modelo padrão de *H. erato* e um modelo-fêmea com 9 *red raylets* (Modelo 4).

Experimento 3: Machos de *H. melpomene* preferem fêmeas de sua própria espécie?

Neste experimento testamos o grau de preferência dos machos de *H. melpomene* para as fêmeas de sua própria espécie em relação às fêmeas de *H. erato* (Figura 6).



Figura 6. Diagrama representando o desenho experimental para o teste do reconhecimento intraespecífico. Imagem da região ventral das asas anterior e posterior. Aos machos de *Heliconius melpomene* serão apresentadas fêmea-modelo de *H. erato* (Modelo 1) e *H. melpomene* (Modelo 2).

Experimento 4: Machos de *H. melpomene* usam pistas quantitativas para discriminar fêmeas de sua própria espécie?

Este experimento testou se a quantidade de elementos de cor na asa de *H. melpomene* influencia na preferência dos machos por estes sinais. Como *H. melpomene* não possui *red raylets*, simulamos variação nos elementos situados acima da faixa amarela da asa posterior. Simulamos dois valores extremos: zero e 6 e testamos a preferência dos machos em relação ao modelo natural, com número de manchas igual a 3 (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Diagrama representando o desenho experimental para o teste de reconhecimento na variação de manchas superiores vermelhas em *Heliconius melpomene*. No qual foi apresentado aos machos de *H. melpomene* um modelo de asa real (Modelo 2) e um modelo com a ausência de manchas superiores vermelhas (Modelo 5). Imagem da região ventral das asas anterior e posterior.



Figura 8. Diagrama representando o desenho experimental para o teste de reconhecimento na variação de manchas superiores vermelhas em *Heliconius melpomene*. No qual foi apresentado aos machos de *H. melpomene* um modelo padrão (Modelo 2) e um modelo com seis manchas superiores vermelhas (Modelo 6). Imagem da região ventral das asas anterior e posterior

Teste de probabilidade

Para cada experimento foi testada a probabilidade de aproximação do conjunto de machos para um determinado modelo usando um teste de verossimilhança (*loglikelihood*) (Merril *et al.* 2014). Para o cálculo dos valores do *loglikelihood*, foi usada a seguinte função:

$$\ln(L) = \sum m_i \ln(P_j) + c_i \ln(1 - P_j),$$

onde m_i é o número de abordagens que o conjunto de machos da espécie i fez ao modelo com coloração controle, c_i é o número de abordagens que o conjunto de machos i fez ao modelo experimental, P_j é a probabilidade do conjunto de machos da espécie J se aproximar do modelo com coloração controle. O valor de P_j foi calculado usando simulações em Excel para achar o valor que maximizasse o valor do $\ln(L)$. Para estimativa do intervalo de confiança (similares aos 95% tradicionais) foi estimado o valor de P_j que reduzisse $\ln(L)$ em duas unidades (Merril *et al.*, 2014).

Resultados

Heliconius erato

Foram realizados três experimentos com *H. erato*. O primeiro experimento testou se os machos eram capazes de discriminar as fêmeas das duas espécies. O *loglikelihood* mostrou que os machos tiveram uma maior probabilidade de aproximação ao seu próprio padrão de coloração do que ao padrão de coloração de *H. melpomene* (Figura 9).

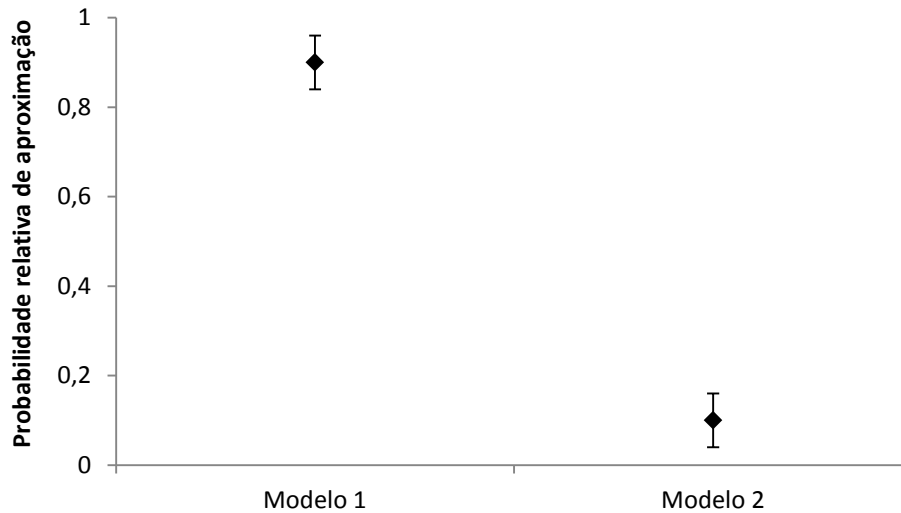


Figura 9. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. erato* ao seu próprio padrão (Modelo 1) e ao padrão de *H. melpomene* (Modelo 2). O intervalo de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

Os experimentos seguintes tiveram o intuito de testar se o padrão de escolha dos machos de *H. erato* é influenciado pelo número de elementos de *red raylets*. Os resultados mostram que o modelo que apresenta pequeno número de *red raylets* possui a mesma resposta que o modelo com padrão normal ou médio da população de *H. erato* (Figura 10). Por outro lado, nos experimentos em que foi apresentado o modelo com extremo de variação dos *red raylets* com 9 elementos, os machos preferiram o modelo com o padrão médio ou normal, em detrimento do modelo com o extremo de variação (Figura 11).

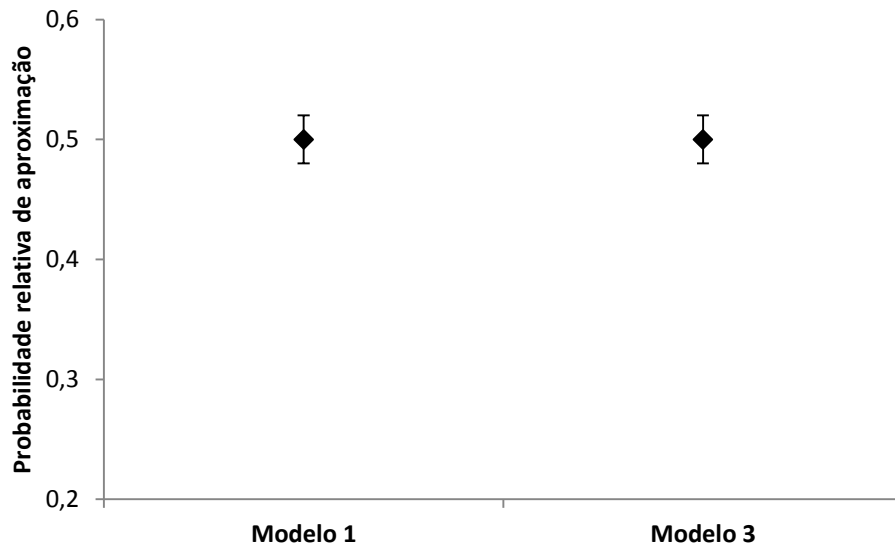


Figura 10. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. erato* ao seu próprio padrão (Modelo 1) e ao padrão mínimo (Modelo 3) de variação nos *red raylets*. O intervalo de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

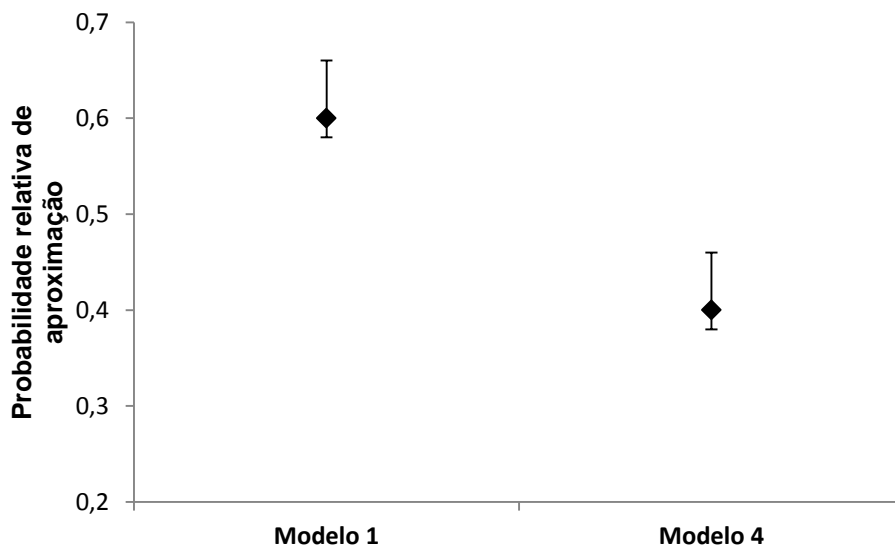


Figura 11. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. erato* ao seu próprio padrão (Modelo 1) e ao padrão máximo (Modelo 4) de variação nos *red raylets*. O intervalo de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

H. melpomene

Foram realizados três experimentos com *H. melpomene*. O primeiro experimento buscou avaliar o grau de preferência dos machos de *H. melpomene* ao modelo de sua própria espécie e ao modelo de *H. erato*. Nossos resultados mostram que machos de *H. melpomene* não diferenciaram os modelos das duas espécies, aproximando-se em igual proporção dos dois modelos (Figura 12).

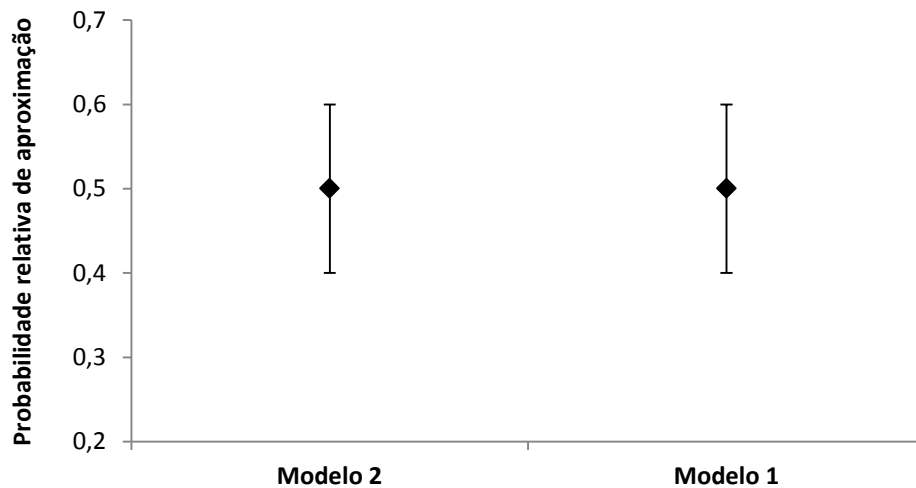


Figura 12. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. melpomene* ao seu próprio padrão (Modelo 2) e ao modelo de *H. erato* (Modelo 1). Os intervalos de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

Os experimentos subsequentes tiveram o intuito de avaliar o uso de pistas quantitativas pelos machos quanto à escolha de fêmeas. Para tanto, foram testados modelo sem nenhum elemento e outro modelo com um extremo de seis elementos. No experimento com modelo sem nenhum elemento os machos não discriminam fêmeas sem elementos de fêmeas com o número médio de elementos (Figura 13).

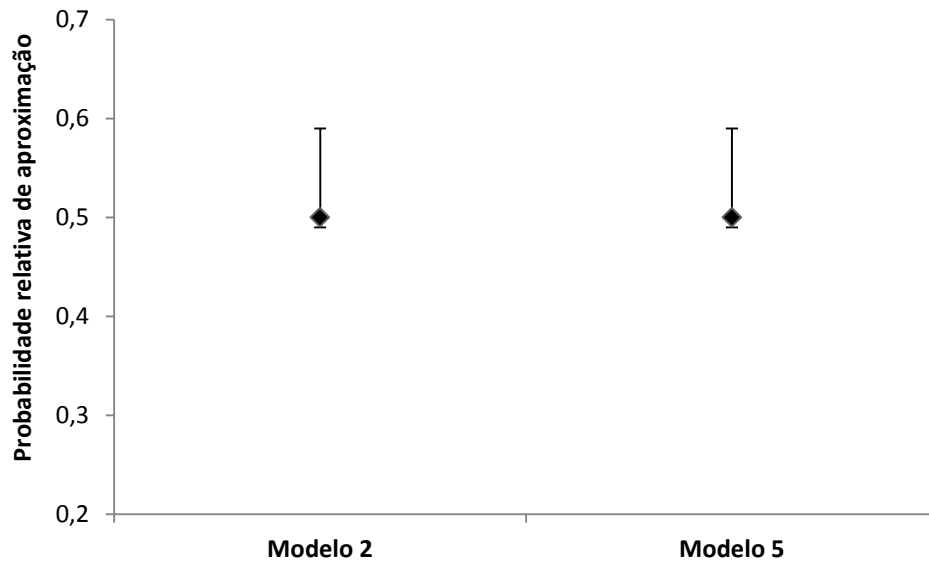


Figura 13. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. melpomene* ao seu próprio padrão (Modelo 2) e ao padrão com zero elementos (Modelo 5). Os intervalos de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

No último experimento, buscou-se verificar se os machos de *H. melpomene* discriminam valores máximos de manchas superiores vermelhas (com modelos que apresentavam seis elementos). Deste modo, foi apresentado aos machos o modelo 2 (seu próprio padrão) e o modelo 6. Os nossos resultados indicaram que os machos de *H. melpomene* preferem o seu próprio padrão em detrimento ao padrão com valores extremos de variação das manchas superiores vermelhas (Figura 14). Portanto, nos dois últimos experimentos obtivemos em nossos resultados que os machos de *H. melpomene* respondem a variações quantitativas nos elementos.

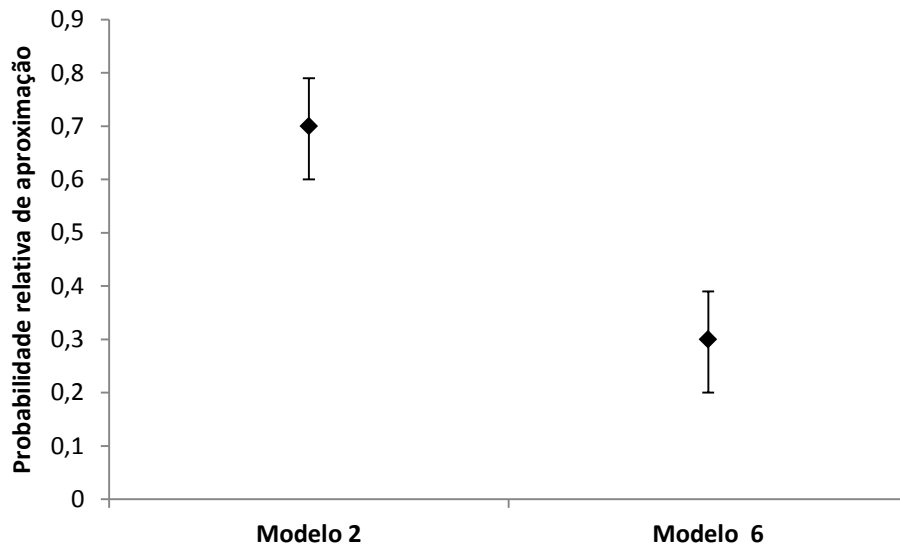


Figura 14. Probabilidade relativa de aproximação dos machos de *H. melpomene* ao seu próprio padrão (Modelo 2) e ao padrão com seis elementos (Modelo 6). Os intervalos de confiança foram obtidos por buscas de valores que diminuem o *loglikelihood* em duas unidades.

Discussão

Os experimentos indicam que as diferenças sutis encontradas nos padrões de asas de *H. erato* e *H. melpomene* podem atuar como pistas de reconhecimento de indivíduos da mesma espécie. Portanto, nossos resultados reforçam a importância das preferências de acasalamento por meio comportamental tendo como sinal a cor das asas em borboletas (McMillan *et al.*, 1997). Igualmente, corroboram estudos anteriores que verificaram a importância do padrão de coloração das asas como um mecanismo de identificação dos parceiros sexuais (Jiggins *et al.*, 2001; Kronforst, 2006a,b; Estrada & Jiggins, 2008; Merrill *et al.*, 2014). Os resultados assemelham-se àqueles que mostram que as barreiras pré-acasalamentos têm um papel importante para a não formação de híbridos (McMillan *et al.*, 1997).

Os machos de *H. erato* são capazes de discriminar fêmeas de sua própria espécie, ao contrário de *H. melpomene*, que abordou os modelos de ambas as espécies em igual probabilidade. Isso parece sugerir que a presença dos *red reylets* seja um sinal

eficaz nos mecanismos de reconhecimento entre indivíduos de *H. erato*, pois somente *H. erato* discriminaram seu próprio padrão, ao contrário de *H. melpomene*.

Embora não tenhamos encontrado diferenças na discriminação entre os modelos de padrão normal e com a presença de dois *red raylets*, obtivemos resultados interessantes quando os machos de *H. erato* não preferiram aqueles modelos com a presença de um número superior ao valor máximo. Isso levar a crer que há um mecanismo comportamental que seleciona contra altos valores de *red raylets*. Portanto, além de reconhecer a presença dos *red raylets* a espécie *H. erato* percebe variações nos mesmos. Assim sendo, é possível que *H. erato* use os *red raylets* não somente como um discriminador da espécie, como também contribui para a uniformização da variação de *red raylets*.

O uso de padrões sutis de cor no reconhecimento de companheiros de acasalamento também foi encontrado em borboletas do gênero *Lycaeides* (Lycaenidae) estreitamente relacionadas. Usando metodologia semelhante a nossa, com modelos artificiais manipulados, os autores determinaram que estas borboletas usam diferenças sutis de padrões em cor de asas como pista de reconhecimento (Fordyce *et al.*, 2002).

Em *H. melpomene* nossos resultados indicam que os machos também preferem valores próximos à média populacional. Isso sugere o potencial de seleção normalizadora para o padrão de cor, confirmando dados de variação em campo (Lopes, 2009). Resultados semelhantes de seleção normalizadora em escolha de parceiros foram encontrados em experimentos que sugerem que a escolha é baseada no brilho na cor das asas dos machos *Hypolimnas alimena* (Kemp *et al.*, 2014). Apesar disto, ou talvez por isto, machos de *H. melpomene* têm maior dificuldade no reconhecimento de co-específicos, pois reconheceram de igual modo os modelos que apresentavam padrões de *H. erato* e os de *H. melpomene*.

Em uma linha geral, os machos de *H.erato* possuem um mecanismo mais refinado no reconhecimento de seus companheiros de acasalamento que machos de *H. melpomene*. Não é clara a razão desta diferença, mas especula-se que a estratégia de acasalamento em pupal, em que os machos acasalam com fêmeas ainda na pupa (Gilbert, 1976) exige que o macho faça buscas periódicas em plantas hospedeiras e reconheça as pupas fêmeas em estágio reprodutivo propício. De certo modo, deve haver um conjunto de estratégias que façam com o macho reconheça pupas fêmeas em estágio reprodutivo propício, sendo que isso leve a que que *H. erato* tenha comportamento mais apurado na escolha. É importante destacar também que nem todas as fêmeas acasalam na pupa, fazendo com que haja a presença de fêmeas virgens que necessitem de corte. Como *H. melpomene* corteja fêmeas em voo, sua estratégia provavelmente o impele a examinar fêmeas em voo, quaisquer que seja a espécie.

Nossos experimentos confirmam que os modelos artificiais foram eficazes na geração de estímulos para os machos. Mesmo com as limitações, pois com a asa de papel não podemos explorar outros tipos de sinais, esse tipo de experimento permite avaliar que borboletas estão respondendo ao padrão de cor (Jiggins *et al.*, 2001). Embora existam a presença de outros elementos envolvidos no reconhecimento dos co-específicos, tais como os sinais químicos, de certo a cor corresponde ao estímulo inicial na identificação de co-específicos (Estrada & Jiggins, 2008). Em *Heliconius*, feromônios irão funcionar após o reconhecimento visual e o início da corte (Estrada *et al.*, 2011). Além disso, a coloração e sinalização química são sinais que atuam de modo integrado no reconhecimento de espécies (Vane-Wright & Boppré, 1993).

O reconhecimento ligado ao padrão de cor da asas é tão refinado que Kronforst *et al.*, (2006) verificou que a escolha comportamental é regida pelos mesmos genes que influenciam na construção da cor em asas de *Heliconius*. Estudos mostram que o

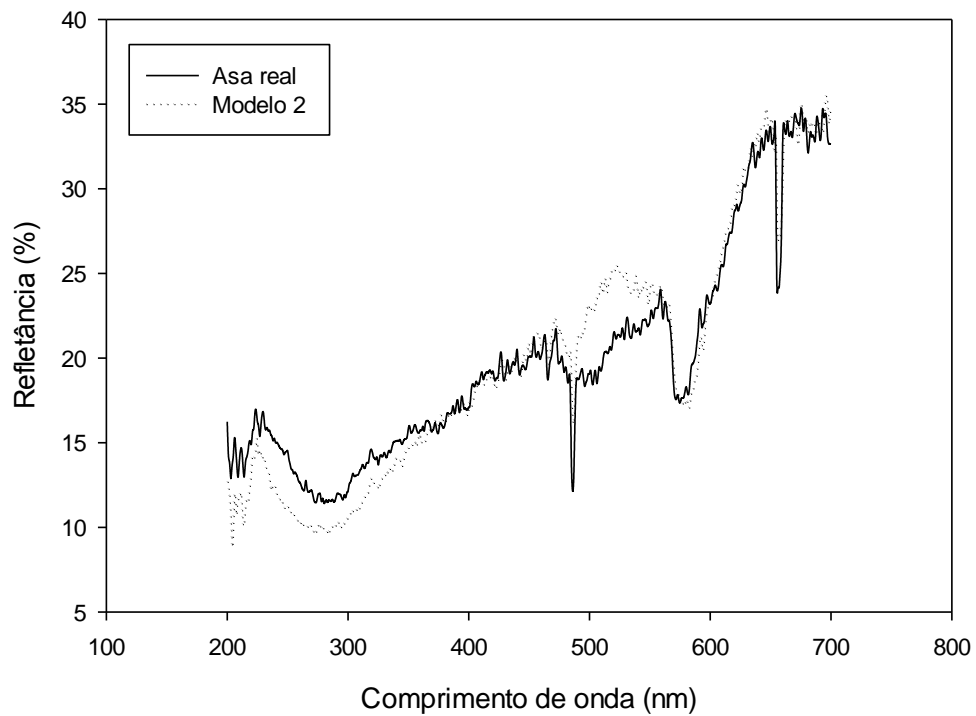
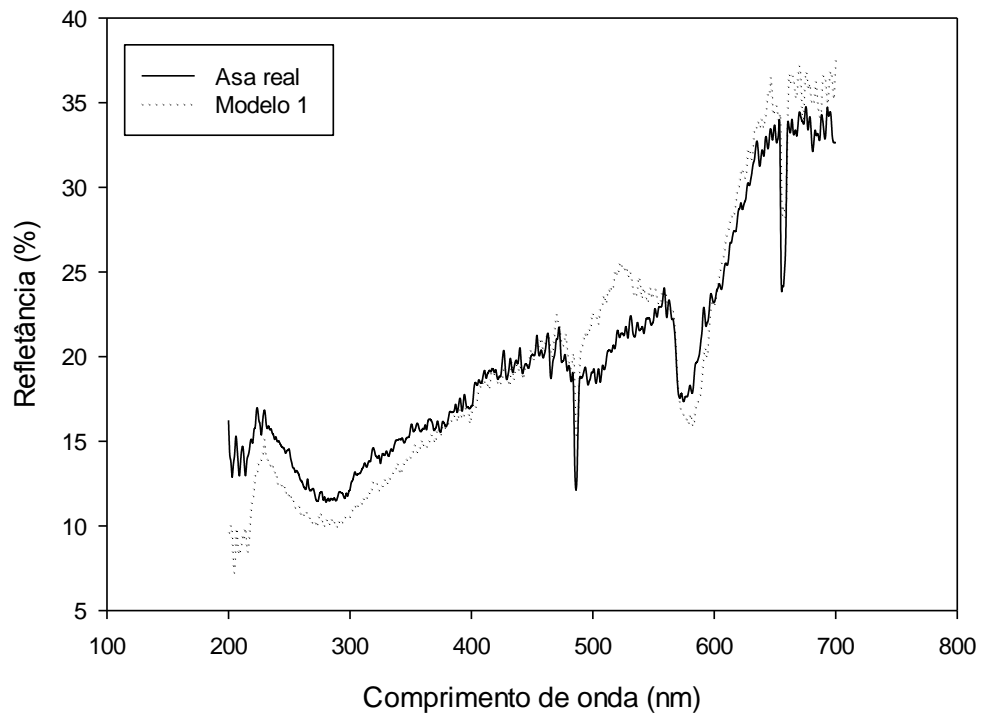
isolamento de habitat e a preferência no padrão de cor são os fatores mais importantes a influenciar no processo de especiação ecológica em borboletas miméticas (Jiggins, 2008). Portanto, o resultado do nosso trabalho reforça ainda mais a importância da cor e, principalmente, de padrões sutis na variação da cor como um sinal usado por borboletas no reconhecimento de seus co-específicos.

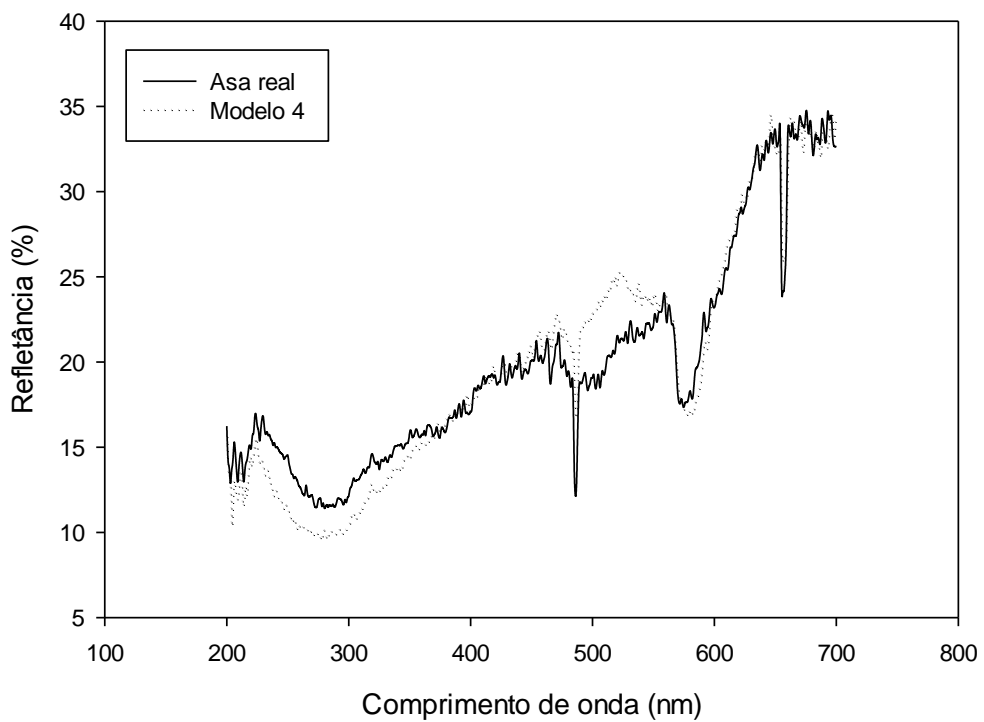
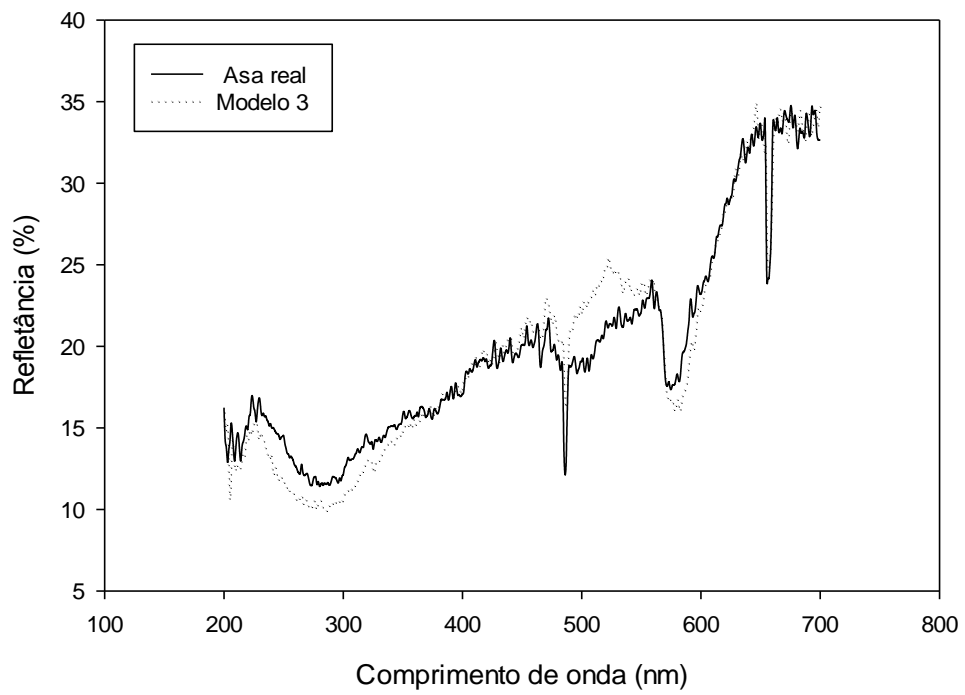
Referências bibliográficas

- Briscoe, A. D. *et al.* 2010. Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. **Proc. Natl Acad. Sci.** 107: 3628–3633.
- Brown, Jr. K. S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology** 26: 427 – 456.
- Estrada, C. & Jiggins, C.D. 2008. Interspecific sexual attraction because of convergence in warning coloration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? **Journal of Evolutionary Biology** 21: 749–760.
- Estrada, C.; Schulz, S.; Yildizhan, S. & Gilbert, Lawrence. 2011. Sexual selection drives the evolution of antiaphrodisiac pheromones in butterflies. **Evolution** 65: 2843–2854.
- Finkbeiner, S.; Briscoe, A. & Reed, R. 2012. The benefit of being a social butterfly: communal roosting deters predation. **Proceedings of the Royal Society B** 279: 2769–2776.
- Fordyce J. A.; Nice C. C.; Forister M. L. & Shapiro A. M. 2002. The significance of wing pattern diversity in the Lycaenidae: mate discrimination by two recently diverged species. **Journal of Evolutionary Biology** 15: 871–879.
- Gilbert LE. 1976. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male-contributed antiaphrodisiac? **Science** 193: 419–420.
- Hines, H. M.; Counternan, B.A.; Riccardo, P.; Moura, P.A.; Cardoso, M. Z.; Linares, M.; Mallet, J.; Robert, D. Reed.; Jiggins, C.D.; Kronforst, M. R. & McMillan, W, O. 2011. Wing patterning gene redefines the mimetic history of *Heliconius* butterflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108: 9666 – 9671.
- Jiggins, C.D., Naisbit, R.E., Coe, R.L. & Mallet, J.L.B. 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. **Nature** 411: 302–305.
- Jiggins, C.D., Estrada, C. & Rodrigues, A. 2004. Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconius melpomene* Linnaeus. **Journal of Evolutionary Biology** 17: 680–691.
- Jiggins, C.D., 2008. Ecological Speciation in Mimetic Butterflies. **BioScience** 58: 541–548.
- Kemp, D. J., Jones, D., Macedonia J. M., Krockenberger, A. K. 2014. Female mating preferences and male signal variation in iridescent *Hypolimnas* butterflies. **Animal Behaviour** 87: 221–229.

- Klein, A. L., & 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.
- Kingsolver, J. G. 1985. Thermal ecology of Pieris butterflies (Lepidoptera: Pieridae): a new mechanism of behavioral thermoregulation. **Oecologia** 66:540–545.
- Kronforst, M. R., L. G. Young, L. M. Blume and L. E. Gilbert. 2006a. Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. **Evolution** 60: 1254–1268.
- Kronforst, M. R.; Young, L. G.; Kapan, D. D.; McNeely, C.; O'Neill, R. J. & Gilbert. L. E. 2006b. Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103:6575–6580.
- Lima, L. L. F. 2009. Biologia populacional comparada de duas espécies de *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) em um ambiente sazonal de floresta Atlântica do nordeste brasileiro. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Rio Grande do Norte. 45pp.
- Maia, R; Eliason, CM; Bitton, P-P, Doucet, SM & Shawkey, MD. 2013. pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. **Methods in Ecology and Evolution**, 10:906-913.
- McMillan, W. O. ;Jiggins, C. D.; Mallet, J. 1997. What initiates speciation in passion-vine butterflies? **Proceedings of the National Academy of Sciences** 16: 8628–8633.
- Oliveira, D. L.; & Araújo, A. M. 1992. Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). IV: Effective and size and variability of the red raylets in natural populations. **Revista Brasileira de Genética** 15: 789–799.
- Pansera, M. C. G. ; Araujo, A. M. 1983. Distribution And Heritability Of The Red Raylets In *Heliconius Erato Phyllis*' (Lepid.; Nymph.). **Heredity** 51: 643–652.
- Ramos, R. & Freitas, A. V. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius eratophyllis* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists Society** 53: 11–21.
- Scott, J. A. 1992. **The Butterflies of the North America: A Natural History and Field Guide**. 584p. Stanford University Press. Stanford, California.
- Swihart, C. A. (1971). Neural basis of colour-vision in Butterfly, *Heliconius erato*. **Journal of Insect Physiology**, 18: 1015–1025.
- Turner, J. R.G. 1981. Adaptation and evolution in *Heliconius*: A defense of neodarwinism. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12: 99–121.
- Vane-Wright, R. I. & Boppré, M. 1993. Visual and chemical signalling in butterflies: functional and phylogenetic perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** 340: 197–205.

Anexo 1: Espectros de refletância de asas naturais e modelos artificiais.





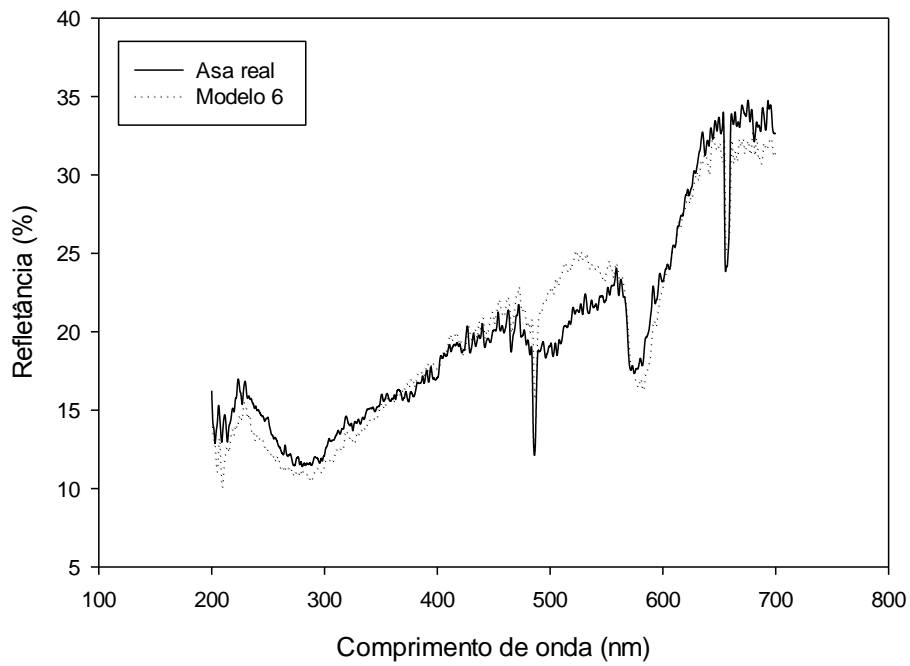
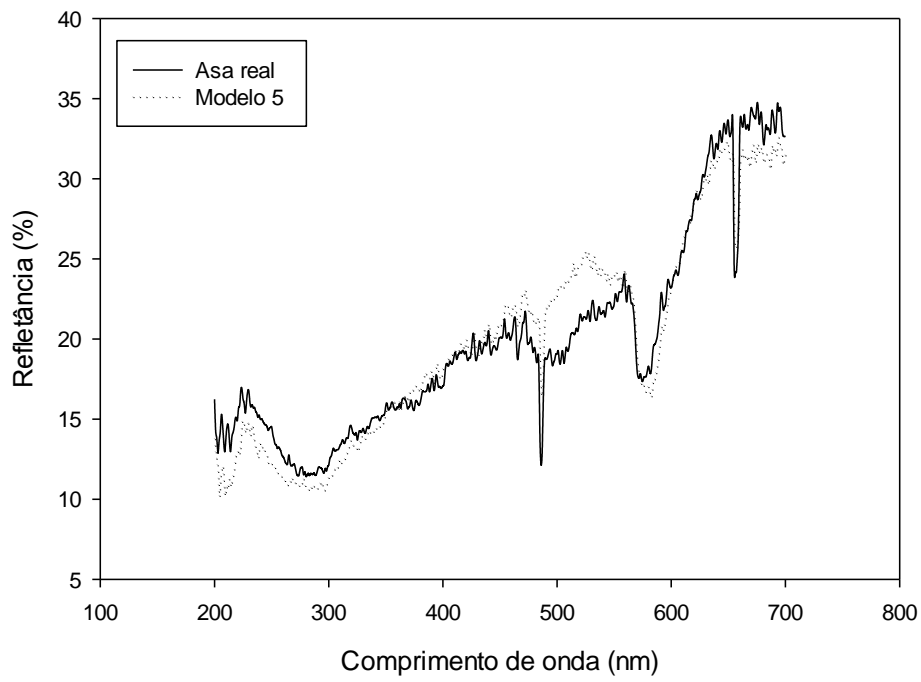
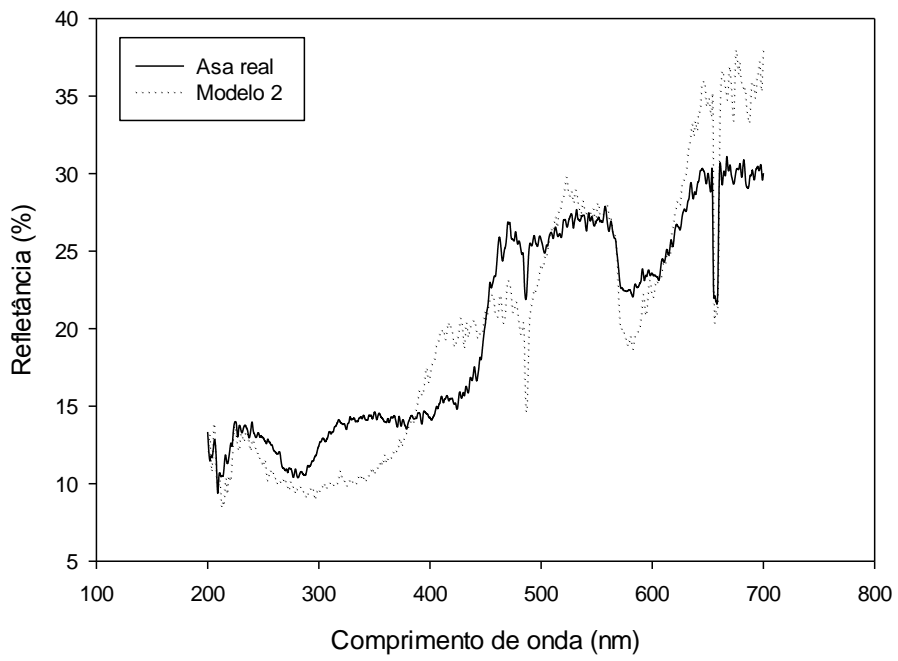
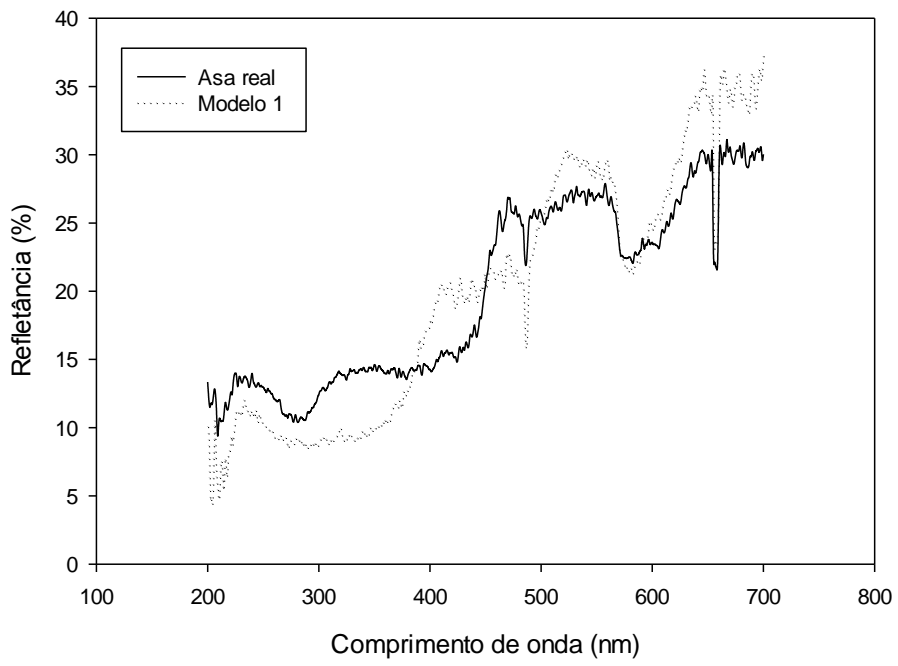
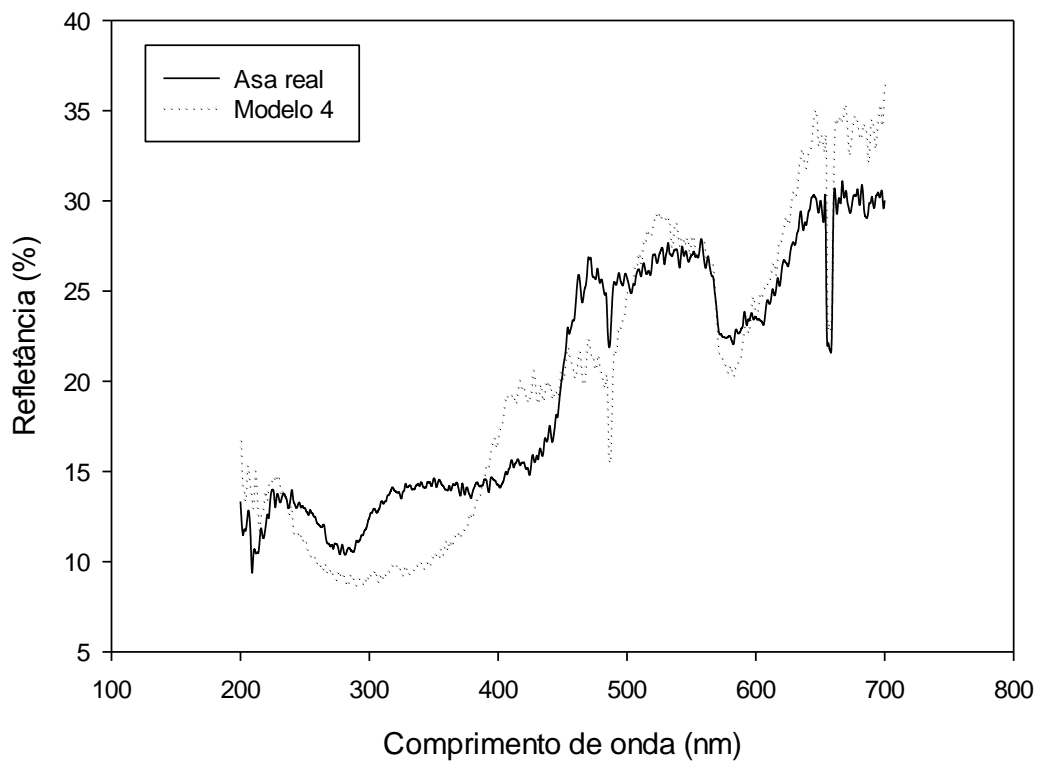
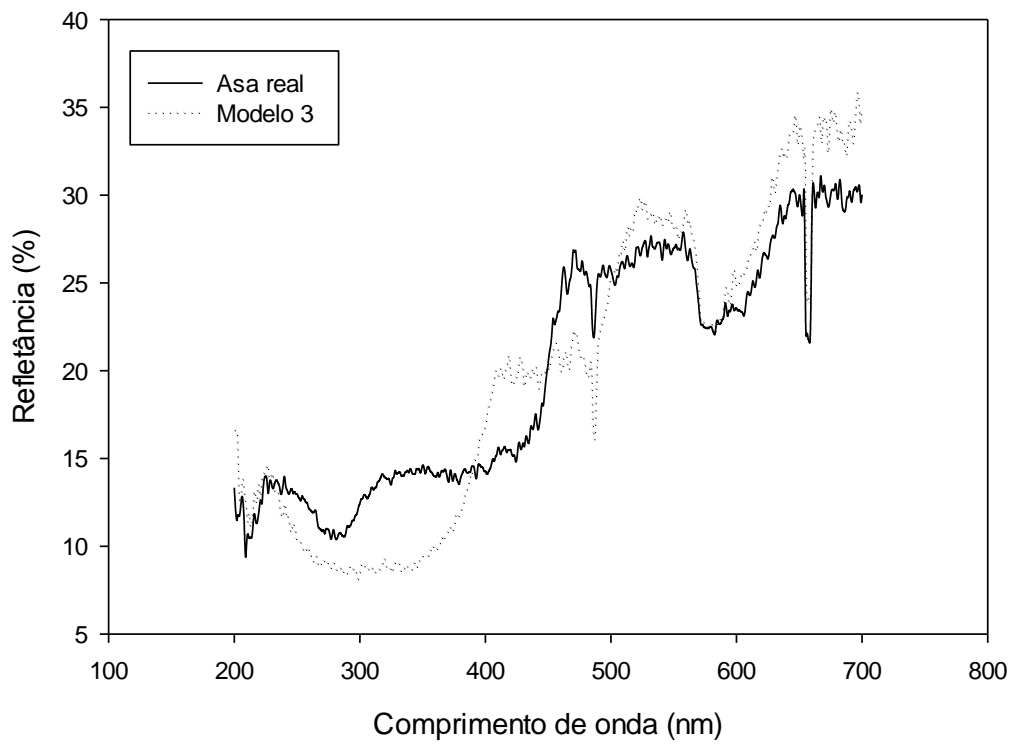


Figura 2: Comparação entre os espectros de refletância da coloração vermelha das asas reais de dos seis modelos apresentados aos machos nos experimentos.





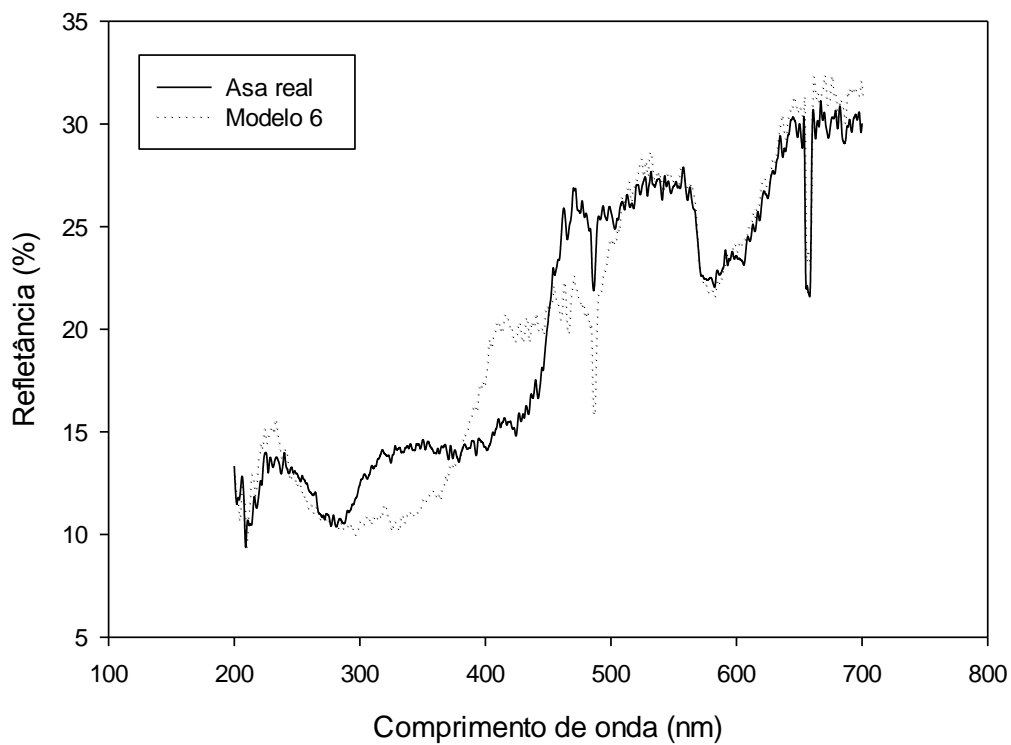
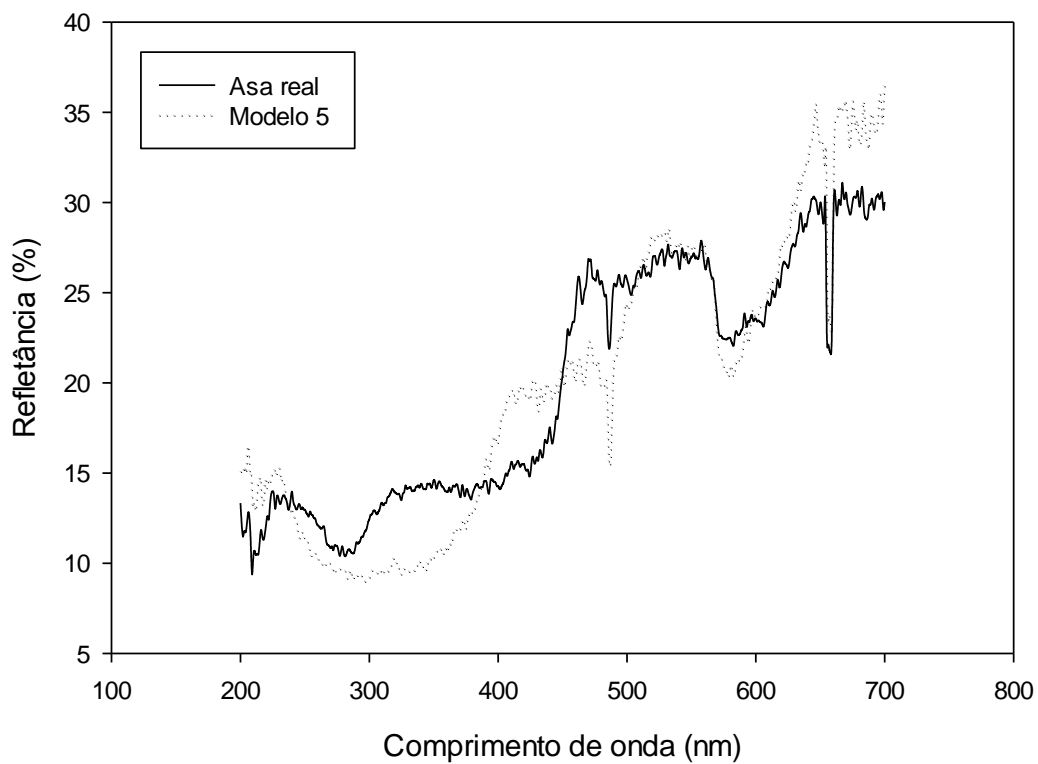
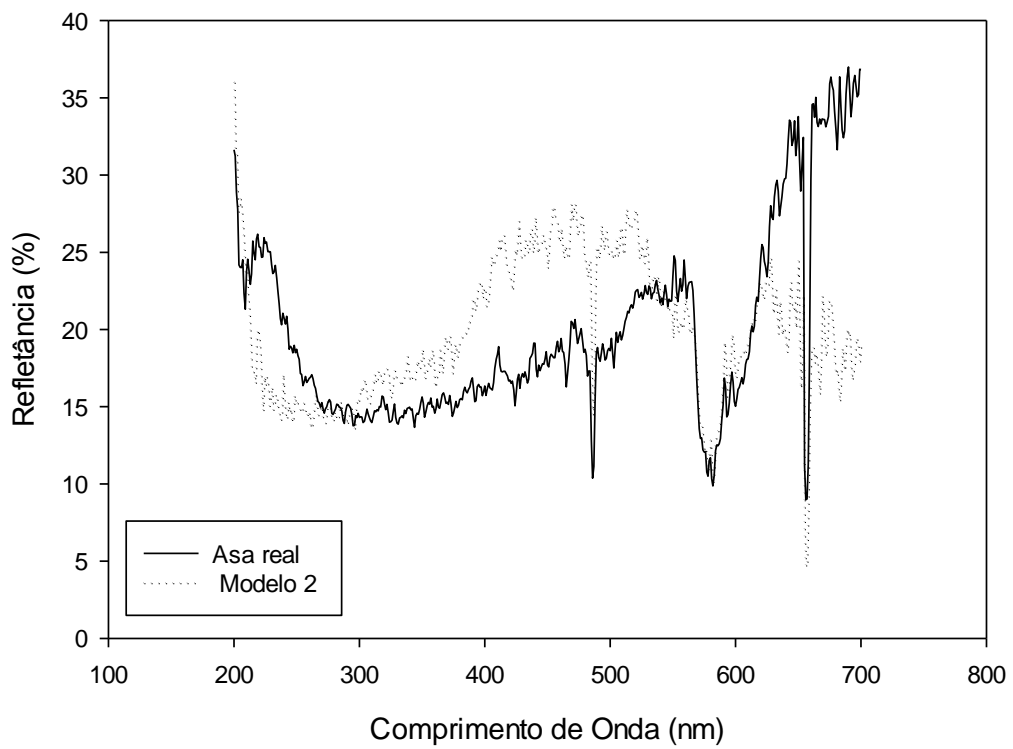
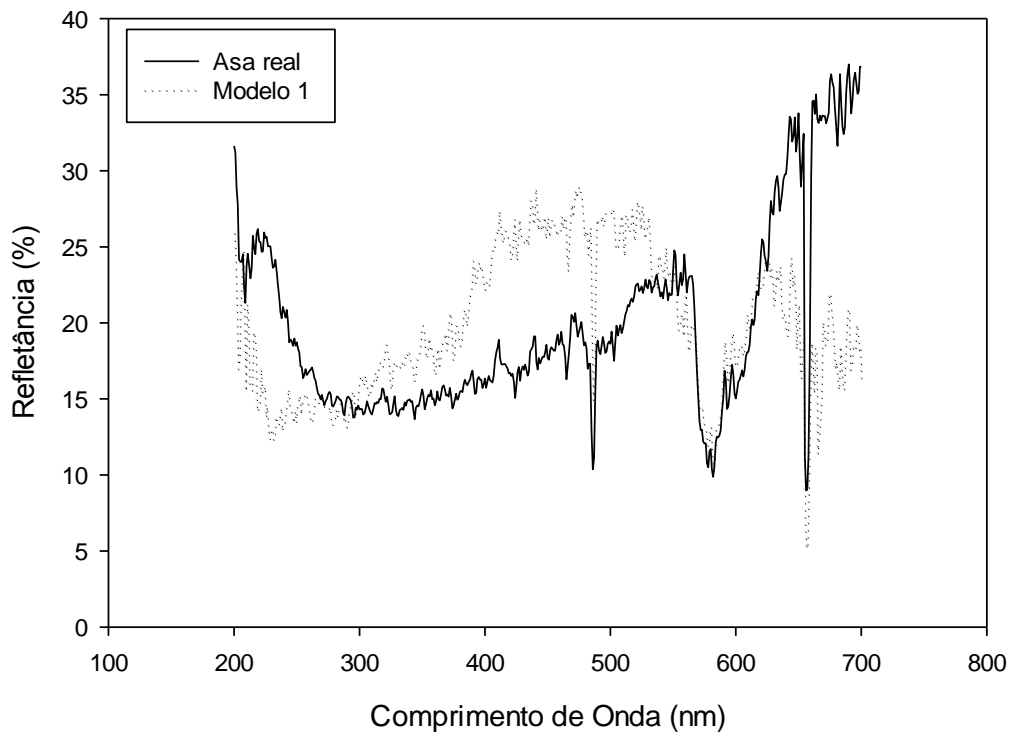
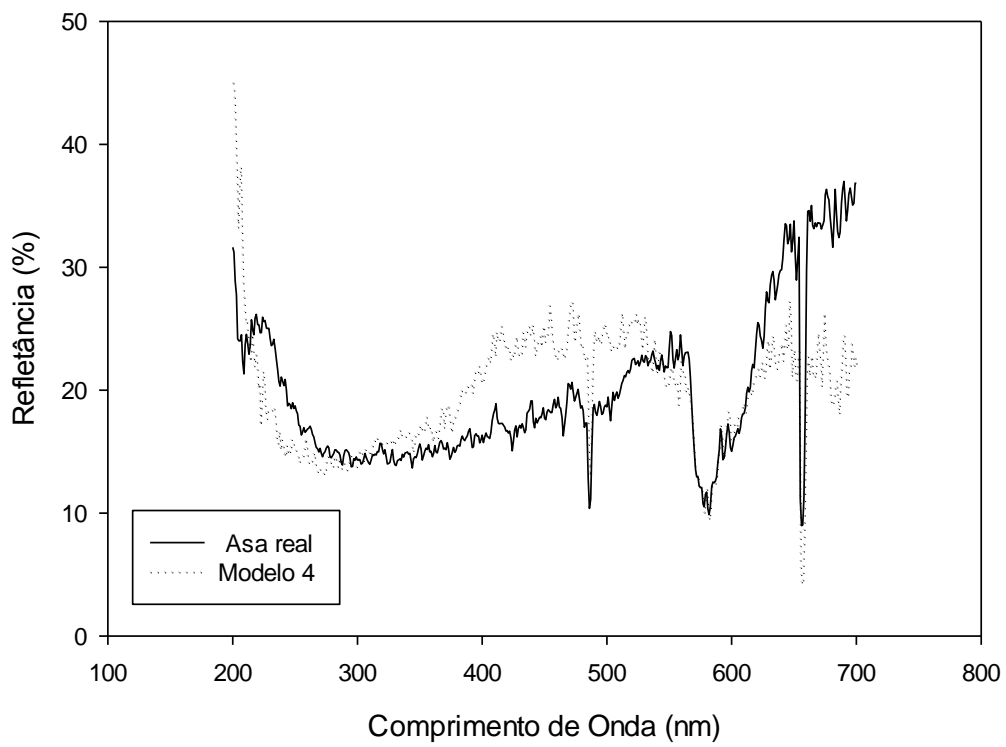
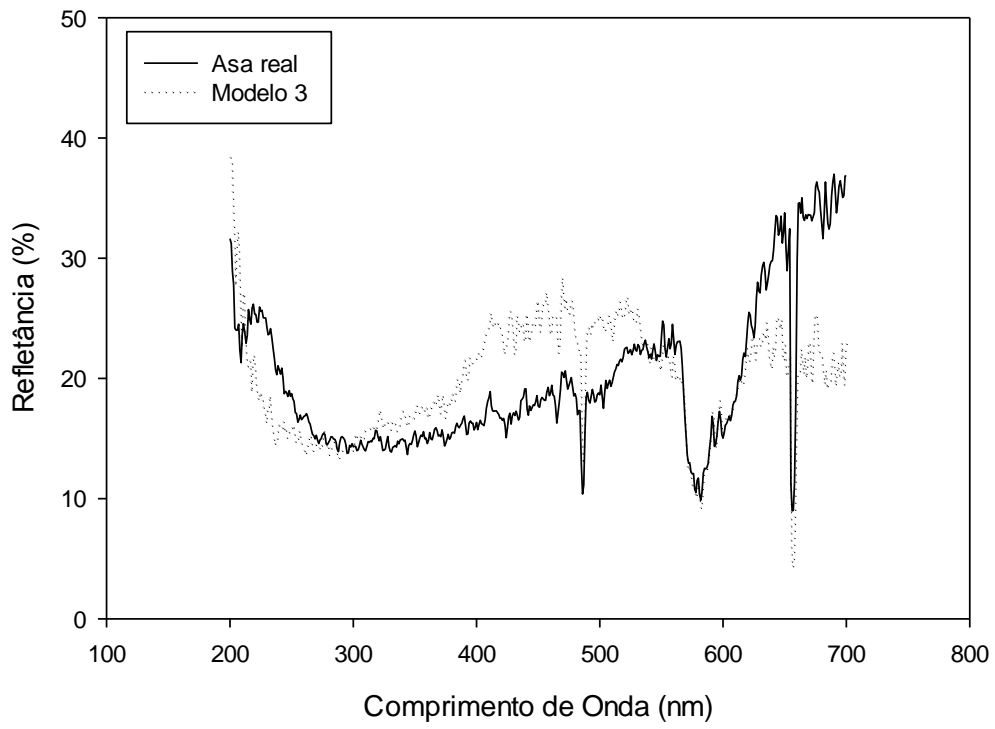


Figura 3: Comparação entre os espectros de refletância da coloração amarela das asas reais de dos seis modelos apresentados aos machos nos experimentos.





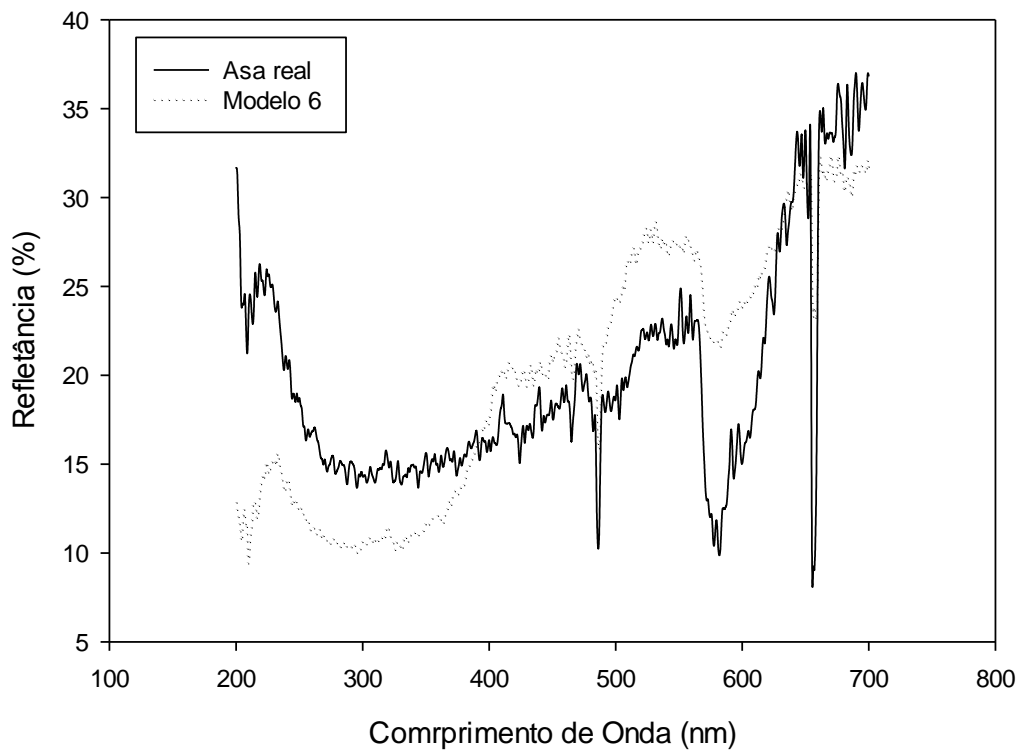
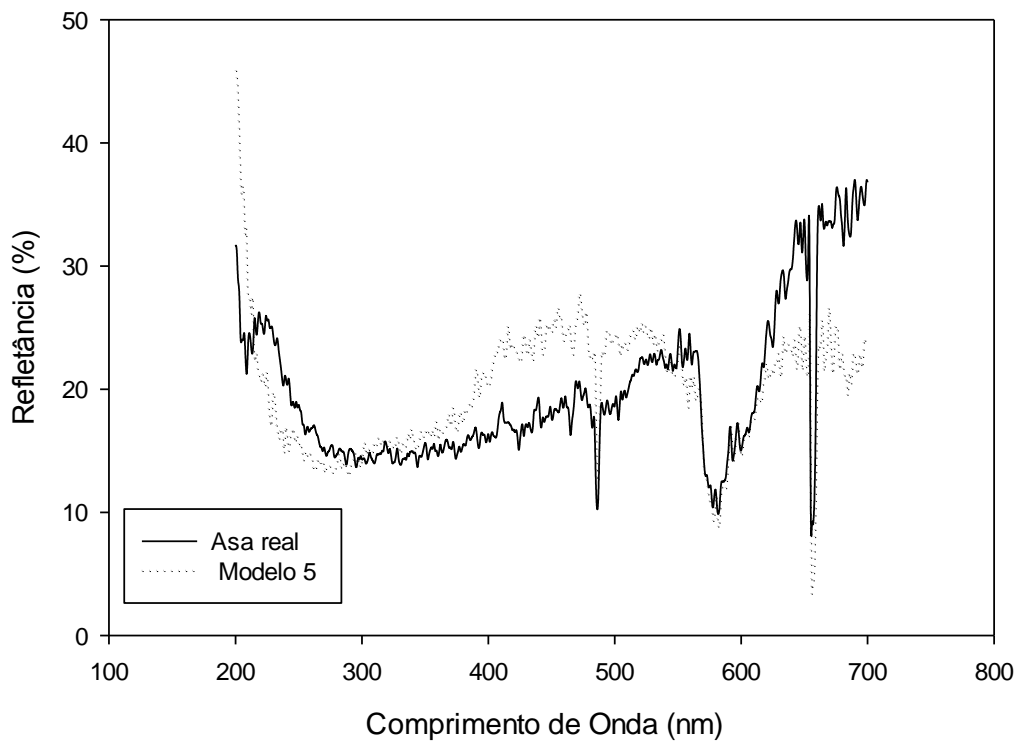


Figura 4: Comparação entre os espectros de refletância da coloração preta das asas reais de dos seis modelos apresentados aos machos nos experimentos.