

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Abordagens Múltiplas Sobre a Modulação Fenotípica em Pupas de
Heliconius erato phyllis (Lepidoptera; Nymphalidae)

Adriano Andrejew Ferreira

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

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientador: Luiz Carlos Kucharski

Porto Alegre, Novembro de 2007

Este projeto de doutorado foi realizado nos Laboratórios de *Genética Ecológica*, *Drosophila* e *Biodiversidade e Evolução* do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este projeto teve o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para o fomento da pesquisa, para a bolsa do doutorando e para bolsa de iniciação científica para o aluno André Klein. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) contribuiu com uma bolsa de iniciação científica para Pedro R. Vieira e posteriormente para Julie G. Zanin.

Aos meus pais, pelo
incentivo e pela
força desde o
princípio.

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo, Aldo M. de Araújo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho; incentivo em continuar o caminho; compreensão, especialmente nas questões familiares; exigências e desafios; e outras tantas coisas que aprendi nesta convivência.

À Renata pela força, auxílio e amor desde o nosso começo.

À Geórgia e Giovana, pela compreensão quando deveria estar presente e não estava.

À minha família pelo apoio, sempre disponível; pelas suas características amáveis e solidárias proporcionando uma base ideal.

Em especial aos meus pais: obrigado por sempre “permitir” e exigir, mesmo nas situações mais adversas, que eu continuasse estudando.

Ao Professor Luis Carlos Kucharski pela participação na questão referente à quantificação da melanização e também orientação sobre os aspectos fisiológicos que fariam parte deste projeto. Estendo o agradecimento aos integrantes do laboratório ao qual o Professor Luiz faz parte.

À Professora Elena Diehl pela identificação das formigas que foi feita pelo Laboratório de Insetos Sociais da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS.

Ao Elmo Cardoso, além do apoio sempre necessário, pela disponibilidade e pela amizade (dá-lhe Inter), e à Ellen Mezzeck, sempre atenciosa e disponível para solucionar problemas burocráticos.

Aos alunos de graduação que estiveram no Laboratório de Genética Ecológica e que de alguma forma contribuíram com este projeto: Teo, Ana Luiza, Marina, Pítia, Viviane, Gustavo, José, Ana, Vanise (ajudou muito, mesmo quando já estagiava em outro laboratório), espero que não tenha esquecido ninguém. Caso sim, peço desculpa.

Aos alunos de iniciação que desempenharam um projeto paralelo ou vinculado ao meu projeto, além de auxiliarem no cuidado com as borboletas e estágios imaturos: Ana Kristina Silva, André Klein, Gabriela Pasqualim, Pedro Vieira e Julie Zanin.

A Daniela (Dani), minha amigona, pelos cafés, trocas de idéias, bate-papo, apoio...mais uma que compreende a dupla jornada, às vezes até “tripla”.

Aos colegas Lucas Caetano, Luis Ernesto, Maurício Almerão e Nicolas Mega, pelas trocas de idéias, ajudas e dicas.

Ao pessoal que fez parte do grupo de trabalho com lepidópteros: Léo, Gustavo, Rejane, Mel, Paim, Luís Fernando, Daisy (*in memoriam*); com os quais certamente aprendi alguma coisa, não somente sobre borboletas.

À Professora Vera Lúcia S. V. Gaiesky por acompanhar este projeto, além de ceder espaço em seu laboratório.

A todo o pessoal do Laboratório de Drosophila (sem esquecer os mais “antigos” que já seguiram outros caminhos) que sempre me auxiliaram quando necessitei.

À Rosane Nunes Garcia que me orientou, ensinou, ajudou... em fim, fez decolar o projeto sobre metilação.

À Professora Helga Winge pelo empréstimo da casa de vegetação no início desta pesquisa.

Ao Professor Josué Sant’Ana pelo auxílio com o projeto sobre vírus.

Ao Professor José Arthur pela câmara de Neubauer.

À Professora Sídia C. Jaques pelo auxílio e dicas na análise estatística.

À Silvia Richter pelas fotos dos géis e pupas.

Aos Professores que contribuíram para minha formação.

A minha chefia do Banrisul que compreendeu a importância do meu afastamento e permitiu que este procedesse.

Ao Sport Club Internacional pelas conquistas de 2006 e 2007: Libertadores e Mundial Interclubes e Recopa.

Ao CNPq, Capes e FAPERGS pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Às *Heliconius erato phyllis*.

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	10
Capítulo 1	13
Introdução Geral	13
Objetivos	18
Capítulo 2	19
On the reliability of a simple method for scoring phenotypes to estimate heritability: a case study with pupal colour in <i>Heliconius erato phyllis</i> , Fabricius 1775 (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Capítulo 3	35
Avaliação da Influência do Fotoperíodo Sobre a Cor da Pupa em <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae)	
Capítulo 4	51
Estimativas sobre o risco de predação em pupas de <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Capítulo 5	80
Descrição do Primeiro Caso de Metilação de DNA em Uma Borboleta: <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Capítulo 6	101
Discussão Geral	101
Referências Bibliográficas	107
Anexo 1.....	110
Seleção Para Fenótipos Extremos na Coloração da Pupa em <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Anexo 2.....	114
Análise da Influência do Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) na Melanização de Pupas e Sobrevivência de <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Anexo 3.....	118
Fenótipo Incomum em <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae).	
Anexo 4.....	124
Pupal Melanization in <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae): Genetic and Environmental Effects.	

Resumo

A presente tese, através de quatro manuscritos, aborda aspectos variados sobre a modulação fenotípica na cor da pupa em *Heliconius erato phyllis*.

O primeiro manuscrito compara e avalia dois métodos de categorização para a cor da pupa através da estimativa da herdabilidade (h^2). O primeiro deles, o método qualitativo, considera quatro escores, variando de 2 até 5, em uma ordem crescente de melanização. O segundo método, quantitativo, utiliza a densidade óptica. Após a captura, as imagens foram analisadas por um software de onde foram obtidos os valores para o grau de melanização de cada exúvia. A partir dos valores obtidos por cada metodologia estimou-se a h^2 pelos métodos da regressão linear e da análise da variância, com o n variando entre 7 e 18 proles. As estimativas da h^2 resultaram em valores semelhantes para ambas às metodologias de categorização das pupas. Desta forma conclui-se que a metodologia qualitativa, por sua praticidade, torna-se a mais indicada para a tarefa. A partir dos baixos valores de h^2 , discute-se o por quê destes resultados. A primeira hipótese considera o tamanho amostral e a segunda a prioridade na alocação de recurso.

O segundo manuscrito avalia a influência do fotoperíodo na cor da pupa em *H. erato phyllis*. Três proles tiveram seus ovos distribuídos entre cinco fotoperíodos: 11L:13E, 12L:12E, 14L:10E, 9L:15E e 24L:00E. Os três primeiros representam fotofases para Porto Alegre (RS - Brasil). A última fotofase indicada é utilizada pelo nosso grupo como tratamento padrão e foi considerado um controle. Os resultados encontrados, através da ANOVA bifatorial indicam uma diferença entre as proles ($p = 0,069$) e não indicam diferença entre os tratamentos. Uma segunda análise foi feita através da ANOVA unifatorial considerando apenas a cor da pupa como dependente dos fotoperíodos. O

resultado indicou uma dependência entre os fatores ($p = 0,047$). Uma terceira análise foi feita a fim de verificar se a diferença observada devia-se aos tratamentos ou fatores genéticos. Para isto comparou-se o tratamento 24L:00E das três proles com um conjunto de 22 proles criadas sob este mesmo fotoperíodo. O resultado aponta para uma diferença genética, concluindo que a cor da pupa em *H. erato phyllis* não é afetada pelo fotoperíodo.

A adaptação de pupas em campo é o tema do terceiro manuscrito. Duas localidades foram utilizadas como área de estudo: Estação de Fitotecnia de Águas Belas (ABE) e Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH). Cem pupas foram colocadas em cada localidade; 50 próximas ao solo e 50 acima de um metro. Dentro de cada nível de altura foram formados 25 pares, sendo 25 camufladas e 25 não-camufladas. Entre as 50 pupas de cada nível havia 25 pupas claras e 25 pupas escuras. Os resultados encontrados indicam uma relação direta da sobrevivência com o nível de altura em que as pupas foram inseridas. A camuflagem e a cor não se mostraram significantes para a sobrevivência da pupa em campo. Pupas implantadas próximo ao solo têm uma chance entre 8 e 13 vezes maior de serem predadas do que pupas acima de 1,0 metro de altura. Estes resultados foram vinculados ao tipo de predador observado em campo: formigas. Duas espécies e um gênero de formigas foram observados predando pupas. Conclui-se que, para pupas próximas ao solo, a camuflagem conferida pela cor não é adaptativa, visto que os principais predadores não dependem da visão.

O último artigo trata da descrição do primeiro caso de metilação em uma borboleta: *H. erato phyllis*. Estudos prévios mostraram que as estimativas da herdabilidade para a cor da pupa nesta espécie, determinadas pelo método da regressão linear, apresentavam valores muito diferentes conforme fossem considerados machos e suas proles ou fêmeas e suas proles. Uma causa possível para esta discrepância poderia ser devido à ocorrência de

metilação do DNA e possível silenciamento dos genes. Através das técnicas MSRE e PCR bissulfito com *primers* aleatórios investigamos a presença de metilação em *H. erato phyllis*. A análise, utilizando DNA de diferentes fases do desenvolvimento, mostrou que a técnica de PCR bissulfito foi particularmente eficiente para indicar a presença de metilação no DNA desta espécie. Isto abre a possibilidade de investigações futuras direcionadas para avaliar se este fenômeno tem relação com a determinação dos padrões diferenciais de coloração das pupas em *H. erato phyllis*.

Por fim esta tese apresenta três anexos. O primeiro trata de um processo de seleção para fenótipos extremos para a cor da pupa em *H. erato phyllis*. Resultados preliminares apontam que o processo é exitoso, porém lento, visto que a variância para a característica permaneciam relativamente alta quando o processo foi interrompido. O segundo anexo aborda o efeito do vírus de poliedrose nuclear na coloração das pupas desta espécie. A hipótese surgiu após o aparecimento de pupas escuras no processo de seleção para pupas claras quando este fenótipo já não era mais esperado. Assim investigou-se o efeito do vírus sobre a cor da pupa bem como sobre a sobrevivência de lagartas de 4º e 5º instar. Os resultados apontam que o vírus não influencia a cor da pupa. Por outro lado, há uma relação direta entre sobrevivência e indivíduos não infectados. O terceiro anexo descreve um fenótipo incomum para *H. erato phyllis*, onde os adultos não apresentavam pigmentos vermelho e amarelo, deixando o imago com um padrão preto e branco ao invés de preto e vermelho.

Abstract

This thesis, through four manuscripts, covers various aspects on the phenotypic modulation in the pupal color of the in *Heliconius erato phyllis*.

The first manuscript evaluate by heritability (h^2) estimative two methods to measure the degree of melanization of pupal exuviae. The first of them, the qualitative method, considers four scores, ranging from 2 to 5, in an ascending order of melanization. The second method, quantitative, uses the optical density. After the capture, the images were analyzed by software from which were obtained values for the degree of melanization of each exuviae. From the values obtained for each methodology the h^2 were estimated by the methods of linear regression and analysis of variance, with n ranging between 7 and 18 broods. Estimates of the h^2 resulted in similar values for both methods of pupal categorization. Thus it is concluded that the qualitative methodology, for its usefulness, it is the most suitable for the task. From the low values of h^2 , we have two hypotheses. The first considers the sample size and the second the allocation priority resource.

The second manuscript evaluates the influence of photoperiod on the pupal colour of *H. erato Phyllis*. Three broods had their eggs distributed between five photoperiods: 11L:13E, 12L:12E, 14L:10E, 9L:15E and 24L:00E. The first three represent photoperiod to Porto Alegre (RS-Brazil). The last indicated photoperiod is used as standard treatment by our group and was considered a control. The results found through the ANOVA two-factors to indicate a difference between the broods ($p = 0,069$) and do not indicate the difference between treatments. A second analysis was done by ANOVA one-factor considering only the pupal colour as a dependent on photoperiod. The results show a dependency among the factors ($p = 0,047$). A third analysis was performed to determine if

the difference observed was due to the treatments or because of the genetic factors. To do this, a comparison at the treatment 24L:00E between the three broods with a set of 22 broods, reared under the same photoperiod, was performed. The result points to a genetic difference, concluding that the pupal colour of the in *H. erato phyllis* is not affected by photoperiod.

The adaptation of pupas in field is the subject of the third manuscript. Two locations were used as the study area: Estação de Fitotecnia de Águas Belas (ABE) and Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH). One hundred pupas were placed in each locality; 50 next to the ground and 50 above one meter. Each level of height were made by 25 pairs (25 cryptic and 25 non-cryptic). Among the 50 pupas of each level 25 pupae were light and 25 were dark. The results indicate dependence between survival and the level of when the pupas were placed. The camouflage and the colour not shown to be significant to the survival of the pupa in the field. Pupae placed near the ground have a chance between 8 and 13 times larger to be preyed than pupae over 1.0 meter tall. These results were linked to the type of predator observed in the field: ants. Two *species* and one *genus* of ants were observed preying pupae. Thus it is concluded that for pupae close to the ground, the camouflage provided by the colour is not adaptive, as the main predators not depend on the vision.

The last article deals with the description of the first case of methylation in a butterfly: *H. erato phyllis*. Previous studies have shown that the estimates of heritability for the pupal colour in this species, determined by the method of linear regression, had different values when were considered male and their broods and female and their broods. One possible cause for this discrepancy could be due to the occurrence of DNA methylation and the possible silencing of genes. Through technical of MSRE and random

primers PCR bisulfite we investigate the presence of methylation in *H. erato phyllis*. The analysis, using DNA from different stages of development, showed that the technique of PCR bisulfite was particularly efficient to indicate the presence of DNA methylation in this species. This opens the possibility of future research directed to assess whether this phenomenon has connection with the determination of differential colour patterns of the *H. erato phyllis* pupae.

Finally this thesis has three appendices. The first is a process of selection for extreme phenotypes for the colour of the pupa in *H. erato phyllis*. Preliminary results indicate that the procedure is successful, however slow, as the variance for the feature remained relatively high when the process was interrupted. The second appendix addresses the effect of nuclear polyhedrosis virus on the pupal colour of this species. The event came after the emergence of dark pupae in the selection process for light pupae, when this phenotype was not more expected. So were investigated the effect of the virus on the pupal colour and on the survival of caterpillars, 4th and 5th instars. The results indicate that the virus does not influence the pupal colour. Moreover, there is a direct relationship between survival and individuals not infected. The third appendices describes an unusual phenotype to *H. erato phyllis*, where the adults had not red and yellow pigments, leaving the imago with a pattern black and white instead of black and red.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Os insetos holometábolos apresentam em seu ciclo vital o estágio de pupa. Este estágio, onde ocorre a metamorfose da larva para adulto, é associado à imobilidade, a qual pode representar ao indivíduo um risco para sua sobrevivência. Portanto, são esperadas, para as pupas, características que confirmam ao indivíduo uma maior chance de sobreviverem a este estágio. Na ordem Lepidoptera, em muitas espécies, a cor da pupa é considerada um fenótipo plástico que se ajusta ao fundo no qual esta está inserida (ver revisão de Hazel - 1995 - para Papilionidae; Angersbach & Kayser, 1971 e Smith, 1980 como exemplo em Pieridae; Starnecker, 1996; Van Dick *et al.*, 1998 e Ferreira *et al.*, 2006 para exemplos em Nymphalidae).

A cor da pupa em *Heliconius erato phyllis* (Figura 1) apresenta uma variação cromática, desde um padrão bem claro, designado como 2 ("branco"), até um padrão bem escuro, categorizado como 5 ("preto"), com diferentes intermediários de coloração, até agora divididos em duas categorias, 3 e 4 (Figura 2). Em relação a este fato surgiram três questões: 1) Em que medida esta variação reflete diferenças genéticas? 2) Qual a influência do ambiente na coloração destas pupas? 3) Existiria uma associação entre os diferentes padrões de coloração e componentes do valor adaptativo? Respostas para as duas primeiras questões foram propostas em meu projeto de Mestrado e publicadas em Ferreira *et al.* (2006). A cor da pupa em *H. erato phyllis* pode ser considerada um caso de modulação

fenotípica (Smith-Gill, 1983) visto que o fenótipo varia continuamente de um padrão claro até um escuro devido à interação entre o genótipo e o ambiente.



Figura 1: Adulto de *Heliconius erato phyllis*.

A modulação fenotípica proposta por Ferreira *et al.* (2006) para a cor da pupa em *H. erato phyllis* esclareceu pontos importantes para este fenótipo. Porém, abriu novas questões referentes a fatores genéticos e ambientais na determinação da cor da pupa desta espécie. Desta forma, este trabalho propõe-se a esclarecer estas questões e mais aquela referente a uma possível adaptação conferida pela modulação fenotípica da coloração da pupa, quando em campo.

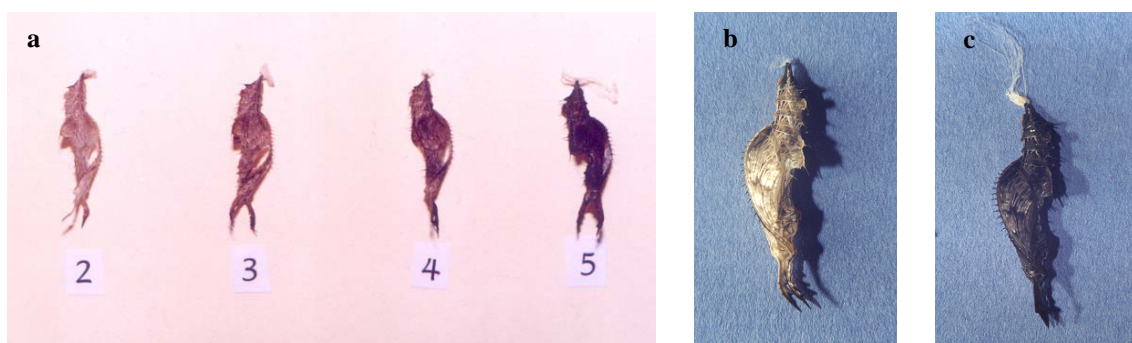


Figura 2: Exúvias e pupas de *H. erato phyllis*: a) exúvias de pupas em escores crescente de melanização; b) exemplar de uma pupa clara (escore 2); c) exemplar de uma pupa escura (escore 5).

A estimativa da herdabilidade (h^2) para a cor da pupa em *H. erato phyllis* calculada em Ferreira *et al.* (2006) utiliza escores qualitativos para determinar este fenótipo. Os valores encontrados para h^2 não foram significantes em nenhuma das estimativas apresentadas. Fora a discrepância encontrada, quando as estimativas da h^2 desta característica, determinadas pelo método da regressão linear, apresentavam valores muito diferentes conforme fossem considerados machos e suas proles ou fêmeas e suas proles, levantamos a hipótese de que um método quantitativo para categorizar as pupas pudesse fornecer informações detalhadas sobre a variação contínua deste fenótipo e assim melhorar a estimativa da h^2 . Este tema é abordado no segundo capítulo desta tese através do artigo “On the reliability of a simple method for scoring phenotypes to estimate heritability: a case study with pupal colour in *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775 (Lepidoptera; Nymphalidae)”, que compara através dos resultados da estimativa da h^2 , dois métodos de categorização para pupas, um qualitativo e outro quantitativo, concluindo que o igual resultado fornecido pelos dois métodos estimula o uso do método quantitativo por ser mais simples e de fácil aplicação.

Os fatores ambientais que atuam sobre a coloração das pupas em lepidópteros podem ser os mais diversos, como por exemplo, os que foram examinados pelos trabalhos de Smith em Papilionidae (1978) e Pieridae (1980), e Smith *et al.* (1988) em *Danaus chrysippus*. A mudança na quantidade de horas de luz por dia é um importante fator que indica mudança nas estações climáticas. A influência deste fator ambiental sobre a coloração das pupas em *H. erato phyllis* foi investigada e os resultados estão apresentados no 3º capítulo da tese. Com base nos resultados conclui-se que o fotoperíodo não afeta a cor das pupas nesta espécie e atribui-se a causas genéticas as pequenas diferenças encontradas.

A vantagem fornecida por um fenótipo plástico para a cor das pupas em lepidópteros está diretamente ligada à camuflagem com o meio, a qual fornece, pelo ponto de vista humano, uma chance maior de sobreviver, visto que a pupa não seria detectada por possíveis predadores visuais. Esta situação foi investigada por diversos pesquisadores e os resultados encontrados dependem do contexto em que a pupa foi considerada (Baker, 1970; Wiklund, 1975; Sims & Shapiro, 1983; Hazel *et al.*, 1987 e Hazel *et al.*, 1998). O capítulo 4 apresenta o artigo “Estimativas sobre o risco de predação em pupas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)”. Os resultados indicam que pupas próximas ao solo possuem um risco maior de serem predadas do que pupas acima de 1m de altura. Estes dados estão relacionados com o principal predador observado: formigas, as quais tornam a camuflagem da cor da pupa com o meio, ineficiente, principalmente próximo ao solo.

Outra questão levantada pelo trabalho de Ferreira *et al.* (2006) refere-se à estimativa da herdabilidade calculada para a cor da pupa. Esta característica, estimada pelo método da regressão linear, diferiu quando eram levados em conta os escores paternos em relação às médias das proles (valores positivos) daqueles quando se considerou os escores maternos em relação às médias das proles (valores negativos). Afastando a possibilidade de herança ligada ao sexo ou influenciada pelo sexo, surgiu a hipótese de que esta situação estaria sendo afetada por fatores epigenéticos. Assim, como um primeiro passo na busca de eventos epigenéticos no genoma de *H. erato phyllis* se iniciou a busca por citosinas metiladas nesta espécie. O capítulo 5 desta tese, “Descrição do Primeiro Caso de Metilação de DNA em Uma Borboleta: *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)”, investiga a presença de citosinas metiladas nesta borboleta, bem como compara o padrão de metilação entre os diferentes estágios de desenvolvimento.

Além dos quatro artigos citados que fazem parte desta tese, são apresentados nos anexos os resultados parciais de um objetivo inicialmente proposto e não concluído e a breve descrição de dois trabalhos, que surgiram no decorrer deste projeto em virtude de anomalias encontradas nos experimentos. O primeiro anexo trata de um processo de seleção para fenótipos extremos para a cor da pupa em *H. erato phyllis*. O segundo anexo relata um experimento desenvolvido para verificar uma anomalia surgida no processo de seleção para fenótipos claros em um período de contaminação viral. O terceiro anexo descreve um fenótipo anormal encontrado em alguns indivíduos adultos de *H. erato phyllis* pertencentes a uma única irmandade; indivíduos com este fenótipo não possuíam os pigmentos vermelho e amarelo, comum em indivíduos normais.

Objetivos

Esta tese tem como objetivo geral esclarecer aspectos relativos à modulação fenotípica da cor da pupa em *Heliconius erato phyllis*.

Objetivos específicos

1. Quantificar o grau de melanização nas exúvias das pupas pelo método de densitometria e repetição dos procedimentos estatísticos para estimar a herdabilidade para a coloração da pupa em proles obtidas por Ferreira *et al* 2006.
2. Testar a influência do fotoperíodo sobre a coloração das pupas de *Heliconius erato phyllis*.
3. Testar se a coloração da pupa de *Heliconius erato phyllis* é adaptativa em seu meio natural.
4. Investigar a presença de metilação no genoma de *Heliconius erato phyllis*.

CAPÍTULO 2

**On the reliability of a simple method for scoring phenotypes to estimate heritability:
a case study with pupal colour in *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775
(Lepidoptera; Nymphalidae)**

Submetido ao periódico *Genetics and Molecular Biology*

**On the reliability of a simple method for scoring phenotypes to estimate heritability:
a case study with pupal colour in *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775
(Lepidoptera; Nymphalidae)**

Adriano Andrejew Ferreira¹, Luiz Carlos Kucharski² and Aldo Mellender de Araújo¹

1. Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.
2. Departamento de Fisiologia e Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: A.M. Araújo, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: + 55-51-33086717; Fax: +55-51-33087311. E-mail: aldomel@portoweb.com.br

Key words: Adaptation against predation; Allocation-priority hypothesis; Butterfly; Optical density; Pupal melanization; Qualitative and quantitative methods.

Abstract

In this paper two methods to measure the degree of melanization of pupal exuviae of the butterfly *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775 (Lepidoptera; Nymphalidae; Heliconiini) are compared. In the first one, qualitative, the exuviae were categorised by scoring for increasing melanization. In the second, quantitative, the exuviae were categorised by optical density and posterior analysis by appropriate software. In order to evaluate both methods we estimated the heritability (h^2) of the degree of melanization by means of two conventional methods: analysis of variance and regression. Results for h^2 were consistent in both methodologies, showing no discrepancies. Since both methodology yield virtually the same results, the qualitative method seems to be more useful, being reliable even for field work. We also discuss another feature of heritabilities, which generally present low values: one possibility is sample size (n ranging from 7 to 18 broods with their parents); another, and much more interesting, hypothesis is related to the so-called *allocation-priority hypothesis*, considering that pupal colour could have lower priority trait as compared to morphology and appropriate development.

Introduction

Butterflies have been traditionally used to solve problems in ecological genetics and evolution (Kapan, 2001; Ruzsczyk et al., 2004; Kronforst et al., 2006; Mavárez et al., 2006; Cardoso & Gilbert, 2007 – as a few examples of recent papers). In his well-known and influential book, Ford (1975, p. 9) emphasized that “among many other forms, the Lepidoptera have up to now been extensively used in ecological genetics. This is partly, but by no means wholly, accidental. [...] their wing-patterns do provide exceptional opportunities for detecting phenotypic variation; and it will be noticed that, in general, they possess a large number of the desirable qualities listed above.” Other qualities can be added, such as the complex life-cycle, during which selection pressures may differentially influence immature and adult forms (Benson, 1971; Mega & Araújo, *in press*). Another well-explored aspect of development is the variation in pupal colour; butterflies can show polymorphic variation with strong environmental influence (Smith, Shoesmith & Smith, 1988; Hazel, Ante & Stringfellow, 1998) or phenotypes with continuous variation (Starnecker & Hazel, 1999).

We recently published a paper on pupal melanization in *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775 (Nymphalidae; Heliconiinae), and on the role played by genetic and environmental factors in the expression of that phenotype (Ferreira, Garcia & Araújo, 2006). In that study, we analysed the results of 28 different broods, inbred and non-inbred, which were submitted to treatments aimed at separating genetic and environmental influences. Pupal phenotypes were scored, for convenience, in discrete units, with 2 as the lightest colour and 5 as the darkest.

The present paper deals with that sample plus additional broods, which were scored as described above. They were also measured according to a continuous scale based on optical density. It is the purpose of this paper to compare both methodological procedures to estimate the heritability of pupal colour in *H. e. phyllis*. We show that, despite the simplicity of the method, which uses few scores based on visual inspection, heritability estimates are as good as those obtained using a more sophisticated methodology.

Material and Methods

Heliconius erato is a Neotropical butterfly which shows a remarkable variety of forms, local breeds, with different wing colours. Local breeds of *H. erato*, together with those of *Heliconius melpomene*, are responsible for one of the most spectacular examples of mimicry (Sheppard, Turner & Brown, 1985). The so-called “East Brazilian Breed”, *Heliconius erato phyllis* has been the subject of many research studies in Brazil for more than twenty years (Saalfeld & Araújo, 1981; Pansera & Araújo, 1983; Périco & Araújo, 1991; Silva & Araújo, 1994; Ramos & Freitas, 1999; Rodrigues & Moreira, 1999, just to mention a few). Adults are easily adapted to living in insectaries, where all stages of the life cycle can be observed and studied.

Rearing immature and adult forms of H. e. phyllis

All pre-adult development of *Heliconius erato phyllis* was carried out under continuous light and at a temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, in a translucent plastic pot (8.5 cm height and 7.5 cm diameter) with white lid and bottom covered with white soft paper. Each pot housed only one caterpillar, which was daily fed with *Passiflora suberosa* or *P. misera*.

Exuviae colour analysis

After adult emergence, each resultant pupal exuviae were compressed between a translucent slide, and the extremities were fixed with a label that carried information on rearing conditions, pupal degree of melanization, sex of the adult, and other particular phenotypes. All slides with pupal exuviae were submitted to two methods of melanization analysis: visual inspection (*qualitative*, hereafter), or measurement of optical density (*quantitative*, hereafter).

In the second procedure, pupal exuviae were measured by optical density using Imagemaster VDS, GE Healthcare equipment. This equipment was set to operate by transmittance, with a yellow filter, aperture f/8, focus 2, and zoom 12. In order to correct any deviations that could be produced by each measure taken, we created a grey scale, which consisted of eight small rectangles coloured from 30 to 100% black, printed on a slide. A total number of four slides with pupal exuviae, plus the slide with a grey scale, were measured at each time. The area chosen in the exuvia corresponded to the butterfly wing. The same slide with the grey scale was used for the measurement of all slides with pupal exuviae. Images were stored and analysed using the software Image J 1.34 m (Wayne Rasband - National Institutes of Health, USA) at a scale of 43.2 pixels/cm. The tool *polygon* was used to draw the figure to be measured in the butterfly wing area; for each exuvia, the software calculated the mean of all pixels of the polygon (pixel scale ranged from 0, for black, to 255, for white). The mean value obtained was designated as *raw exuvia score* (RES).

In order to correct for eventual deviations in image capture by VDS Imagemaster, we chose the rectangle in the grey scale corresponding to 60% black. On this rectangle, the tool *polygon* was again used to draw a figure equivalent to that in the exuviae to be

analysed by the software Image J 1.34m. The obtained value was designated *control by capture* (CC). After all slides were measured (n = 648), the mean was estimated, which we called *mean of the controls* (MC); by dividing CC by MC, *correction ratio* (CR) was obtained. The RES/CR ratio for each measured exuvia was then calculated, and this new ratio was used to estimate heritability.

Heritability of pupal colour

Heritability estimates (h^2) were calculated by conventional regression and analysis of variance methods for both, the qualitative and quantitative methods. Details followed in the qualitative method, which were repeated in the quantitative one, can be found in (Ferreira, Garcia, and Araújo, 2006). Sample sizes utilized in this work are a little different from our previous paper, since we tried to balance the number of exuviae examined in the two methods.

Results

Table 1 shows heritability estimates as calculated by the methods of regression and analysis of variance for qualitative scoring of pupal colour. Heritability values were virtually the same as those published by Ferreira, Garcia & Araújo (2006). Two comments can be made about these results: firstly, irrespective the method used to estimate heritability (regression or analysis of variance), h^2 value was low, statistically not different from zero (there are two values near significance – see the footnote in Table 1). Secondly, when female parent score value was taken as the independent variable in regression, heritability estimates were lower than all other values (in Table 1, h^2 negative values). It

can be noted that the number of broods, when only mother score was considered, was higher than that of male parent. This is due to the fact that, in some crosses, we were not able to identify which male copulated with the female. However, as *H. e. phyllis* females are monogamic, this did not influence heritability estimates. Heritabilities estimated by the optical density method are shown in Table 2. Despite employing a continuous scale for exuviae phenotypes, h^2 values were of the same order of magnitude as those obtained by the qualitative method. Again, no values were statistically different from zero, although the results for the male parent (second column, Table 2) were somewhat higher than the corresponding values in the qualitative method. The results using the midparental value as the independent variable in regression analysis were similar to those obtained by analysis of variance, and h^2 values, when the female value is used as independent variable, remained low and negative. Scatter diagrams showing midparental value relative to mean sibship or male or female sibship values are presented in Figure 1.

Discussion

Following the traditional approach of ecological genetics, we observed that pupae of the butterfly *Heliconius erato phyllis* indeed show variation in colour (from light to dark), both in the field and in the insectary. Variation is the first condition for natural selection; however, in order to evolve, phenotypes, such as like pupal colour, must be inherited. This is why we estimated the heritability of this trait (the possible role of natural selection is now being studied by our group). The results here reported, which compared two methods for scoring pupal colour, showed that this trait has low heritability value. The meaning of this finding in an evolutionary context is, in our opinion, as important as the

evaluation of the two methods employed for scoring pupal colour. The first method, qualitative, based on a scale of increasing melanization from 2 to 5, was established after visual inspection of the exuviae by two of the authors, simultaneously (AAF and AMA). The other method, with a more demanding routine, was based on optical density, which resulted in a continuous melanization scale. As we showed here, both methods yielded almost equal heritability estimates. As it is easier to score pupal phenotypes by visual inspection, which can be performed during field work, we propose that it is accepted as a reliable method.

Due to the fact that pupal melanization in *H. erato phyllis* presented almost equal heritability values using both methods, one question prevails: why a phenotype, which is presumably related to survival, should have low heritability values? To make things more difficult, our previous results (Ferreira et al., 2006) showed that pupal colour in that species is strongly influenced by the environment. There are at least two reasons for such findings: firstly, as Falconer (1989) has pointed out, in order to obtain significant heritability estimates, a large number of parents and offspring (more than 100) is necessary to achieve a small standard error when heritability estimates are calculated by offspring-parent regression. Secondly, the failure to obtain a high heritability value depends on the trait being measured. Glazier (2002) discussed a very interesting possibility, which he called the *allocation-priority hypothesis*. Under this hypothesis, low priority traits in the resource-allocation system are more affected by environmental variation, reducing their heritabilities. A priority rule in the case of pupation is its appropriate development and morphology, and secondarily, its colour. Colour, or in the case here studied, melanization of the pupa, should be viewed as an improvement in the chances of survival in the presence of visual predators. As a matter of fact, we tested the effects of different degrees of

melanization on the survival of pupae in nature. Our results strongly support the hypothesis that colour is not an important variable in pupal mortality, as their main predators in the studied area were ants (Ferreira and Araújo, in preparation). Glazier's suggestion, however, despite being extremely interesting, needs to be carefully tested under field and laboratory conditions.

Acknowledgements – The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support, and thank the colleagues of the Ecological Genetics group (Department of Genetics, UFRGS), for their assistance in rearing the butterflies.

References

- Benson WW (1971) Natural selection for Müllerian mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science* 176: 936 – 939.
- Cardoso MZ & Gilbert LE (2007) A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). *Naturwissenschaften* 94: 39 – 42.
- Falconer DS (1989) *Introduction to Quantitative Genetics*. 3rd edn. Longman Scientific & Technical, Essex, UK.
- Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.
- Ford EB (1975) *Ecological Genetics*. 4th edn. Chapman and Hall, London, UK.
- Glazier DS (2002) Resource-allocation rules and the heritability of traits. *Evolution* 56 (8):1696-1700.

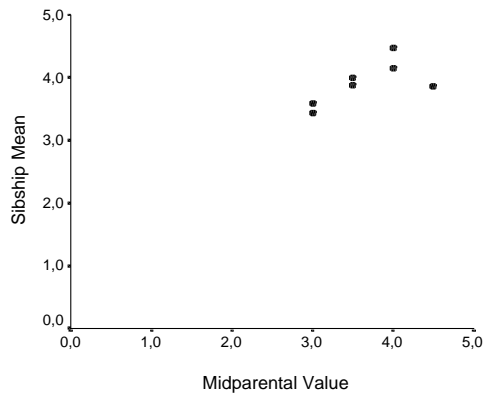
- Hazel W, Ante S & Stringfellow B (1998) The evolution of environmental-cued pupal colour in swallowtail butterflies: natural selection for pupation site and pupal colour. *Ecological Entomology*. 23: 41 – 44.
- Kapan DD (2001) Three-butterfly system provides a field test of Müllerian mimicry. *Nature* 409: 338 – 340.
- Kronforst MR, Young LG, Blume LM & Gilbert LE (2006) Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. *Evolution* 60(6): 1254 – 1268.
- Mavárez J, Salazar CA, Bermingham E, Salcedo C, Jiggins CD & Linares M (2006) Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature* 441: 868 – 871.
- Mega NO & Araújo AM (in press) Does caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera; Nymphalidae, Heliconiinae) show evidences of adaptive behaviour to avoid ant predation? *Journal of Natural History*.
- McWhirter K (1969) Heritability of spot-number in scillonian strains of the meadow brown butterfly (*Maniola jurtina*). *Heredity* 24: 314 – 318.
- Pansera MCG & Araújo AM (1983) Distribution and heritability of the red raylets in *Heliconius erato phyllis* (Lepid.; Nymph.). *Heredity* 51: 643-652.
- Périco E & Araújo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Evolución Biológica*. 5: 59 – 74.
- Ramos RR & Freitas AVL (1999) Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists Society* 53(1): 11 – 21.
- Rodrigues D & Moreira GRP (1999) Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep. Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. *Journal of the Lepidopterists Society*. 53(3): 108 – 113.
- Ruszczyk A, Motta PC, Barros RL & Araújo AM (2004) Ecological correlates of polyphenism and gregarious roosting in the grass yellow butterfly *Eurema elathea* (Pieridae). *Brazilian Journal of Biology*. 64(1): 151 – 164.
- Saalfeld K & Araújo AM (1981) Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera; Nymphalidae). I. Demography of a natural population. *Revista Brasileira de Biologia*. 41(4): 855 – 860.

- Sheppard PM, Turner JRG & Brown Jr KS (1985) Genetics and evolution of muellerian mimicry in *Heliconius* butterflies. Philosophical Transaction of The Royal Society of London B (Biological Sciences). 308 (1137): 433 – 613.
- Silva LM & Araújo AM (1994) The genetic structure of *Heliconius erato* populations (Lepidoptera; Nymphalidae). Revista Brasileira de Genética. 17(1): 19 – 24.
- Smith DAS, Shoesmith EA & Smith AG (1988) Pupal polymorphism in the butterfly *Danaus chrysippus* (L.): environmental, seasonal, and genetic influences. Biological Journal of The Linnean Society. 33: 17 – 50.
- Starnecker G & Hazel W (1999) Convergent evolution of neuroendocrine control of phenotypic plasticity in pupal colour in butterflies. Proceedings of The Royal Society of London B. 266: 2409 – 2412.

Figure 1: Scatter diagrams of midparental value (abscissa) and mean sibship value, male sibship value, female sibship value (ordinate). Left: results of qualitative method (a, b, and c); right: results of the quantitative method (d, e, and f). Units of scale: qualitative method, scores of melanization; quantitative method, corrected exuviae score by optical density. See Material and Methods for details.

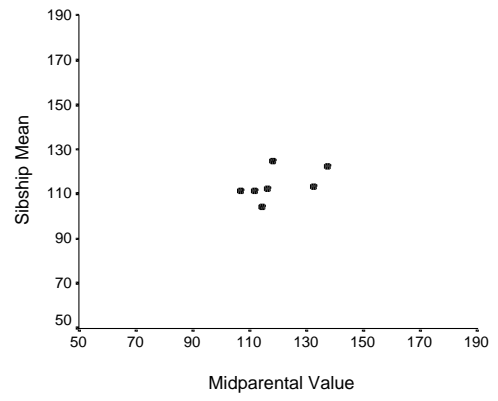
Qualitative

a)

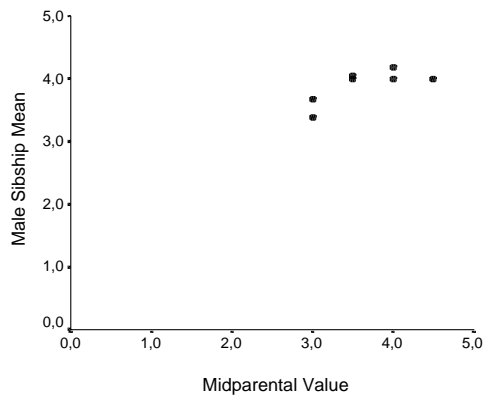


Quantitative

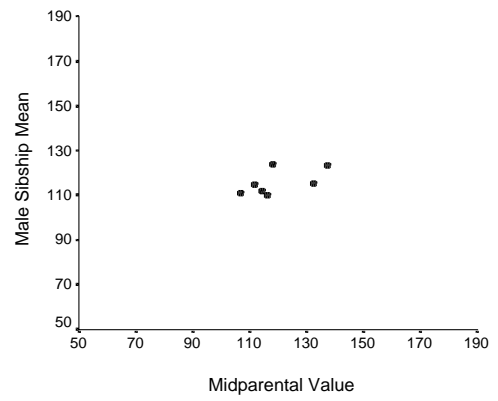
d)



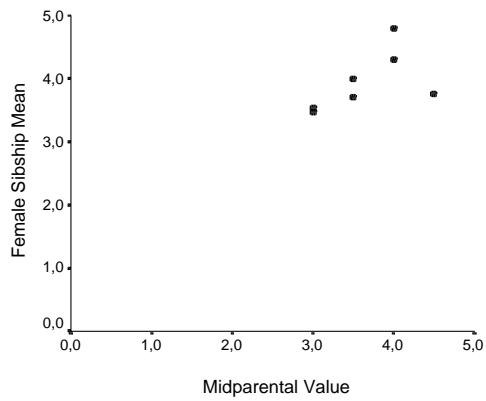
b)



e)



c)



f)

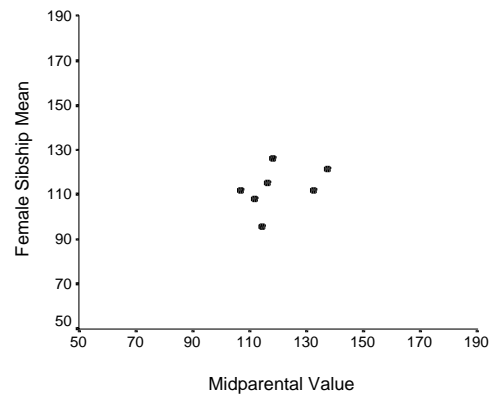


Table 1: Heritability estimates ($h^2 \pm$ s.e.) calculated by regression and analysis of variance (ANOVA, inbred broods are not included) based on a qualitative melanization score . Total number of broods used between parenthesis.

Sibship	Regression (Parent x offspring)			ANOVA
	Midparental value	Male parent	Female parent	
Mean	0.40 ± 0.21 (7)	0.44 ± 0.28 (7)	-0.11 ± 0.23 (12)	0.31 ± 0.11 (18)
Males	0.36 ± 0.15 (7) ¹	0.43 ± 0.20 (7) ²	-0.20 ± 0.24 (12)	0.34 ± 0.13 (18)
Females	0.47 ± 0.32 (7)	0.49 ± 0.41 (7)	-0.01 ± 0.26 (12)	0.32 ± 0.12 (18)

¹ p = 0,064 ² p = 0,083

Table 2: Heritability estimates ($h^2 \pm$ s.e.) calculated by regression and analysis of variance (inbred broods are not included) based on a continuous (quantitative) melanization scale . Total number of broods used between parenthesis.

Sibship	Regression (Parent x offspring).			ANOVA
	Midparental value	Male parent	Female parent	
Mean	0.31 ± 0.25 (7)	0.61 ± 0.30 (7)	-0.04 ± 0.20 (12)	0.30 ± 0.10 (18)
Males	0.30 ± 0.18 (7)	0.42 ± 0.27 (7)	-0.03 ± 0.19 (12)	0.29 ± 0.12 (18)
Females	0.34 ± 0.36 (7)	0.84 ± 0.42 (7)	-0.06 ± 0.27 (12)	0.32 ± 0.12 (18)

CAPÍTULO 3

Avaliação da Influência do Fotoperíodo Sobre a Cor da Pupa em *Heliconius erato* *phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Este manuscrito será submetido ao periódico *Journal of the Lepidopterists' Society*

**Avaliação da Influência do Fotoperíodo Sobre a Cor da Pupa em *Heliconius erato*
phyllis (Lepidoptera; Nymphalidae)**

Adriano Andrejew Ferreira e Aldo Mellender de Araújo

Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras-chave: Borboleta, Cor da Pupa, Fotofase, Influência Ambiental

Resumo

Fatores ambientais afetando a cor da pupa em Lepidoptera é um tema bastante investigado. A influência de ambientes claros e escuros no condicionamento da cor da pupa na borboleta *Heliconius erato phyllis* foi investigada e confirmada em um outro trabalho, executado pelos mesmos autores deste. O fotoperíodo, não investigado no referido trabalho, é uma fonte de variação ambiental importante e comprovada para algumas espécies de lepidópteros. Assim, o presente trabalho aborda a influência de diferentes fotofases no condicionamento da cor da pupa em *H. erato phyllis*. A fim de verificar este fator ambiental, três proles foram comparadas em relação aos efeitos de cinco tratamentos. A análise do fotoperíodo por proles não indica influência deste sobre a cor da pupa. Uma segunda análise considerando apenas a cor da pupa como dependente do fotoperíodo, mostra uma diferença no limiar da significância. Este fato motivou uma terceira análise a fim de verificar se as diferenças encontradas referiam-se as fotofases ou se eram diferenças genéticas.

Introdução

Uma investigação anterior, sobre a influência de fatores ambientais no condicionamento da cor das pupas em *Heliconius erato phyllis*, mostrou que lagartas de 5º estágio, submetidas a ambientes claros ou escuros induziam a formação de pupas respectivamente claras ou escuras (Ferreira *et al.*, 2006). Todavia, uma outra possível variável influente sobre a cor das pupas, não investigada no trabalho referido, poderia ser o fotoperíodo. Autores como Smith (1978; 1980), Hazel & West, (1983) já trataram deste tema. Smith encontrou para duas espécies de Pieridae (*Pieris rapae* e *P. brassicae*) e *Papilio polytes* uma forte associação entre o fotoperíodo e a cor da pupa, sendo que *P. rapae* forma pupas escuras em fotofases de inverno. Hazel & West (1983) avaliaram quatro espécies de Papilionidae: *P. polyxenes* e *P. troilus* foram fortemente influenciados pelo fotoperíodo de inverno formando pupas marrons. As outras duas espécies investigadas não foram afetadas pelo fotoperíodo (*Battus philenor* e *Eurytides marcellus*).

Tendo em vista os resultados encontrados nos trabalhos referidos acima, decidiu-se investigar esta questão no presente trabalho, partindo do princípio que a correta interpretação de informações fornecidas pelo ambiente pode se constituir em uma vantagem para a sobrevivência do organismo e que em outras espécies de Lepidoptera a coloração da pupa é um fenótipo que pode responder as mudanças na quantidade de horas de luz.

Material e Métodos

Fêmeas de *Heliconius erato phyllis* foram isoladas em insetário (2m x 2m x 3,5m) para oviposição. Um primeiro procedimento foi adotado para análises dentro de uma prole, no qual apenas uma fêmea ovipositava em um insetário. Um processo alternativo foi utilizado com o intuito de tornar aleatória as diferenças genéticas em nossos resultados. Para isto, várias fêmeas de *H. erato phyllis*, com um mínimo de 7 e no máximo de 15 indivíduos, permaneciam juntas em um mesmo insetário para oviposição. Este grupo de fêmeas não permaneceu constante durante o tempo de experimento, sendo que novas fêmeas fecundadas eram acrescentadas ao grupo, enquanto que outras eram retiradas do local.

Os insetários foram supridos com as plantas hospedeiras preferências de *H. erato phyllis*: *Passiflora suberosa*, *P. misera* e *P. capsularis* (Périco & Araújo, 1991). Os adultos foram alimentados diariamente com uma mistura de água, mel e pólen. Os ovos foram coletados diariamente e acondicionados individualmente em potes plásticos, translúcidos, com a tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro). O fundo do pote foi coberto por um papel absorvente branco, para retenção de umidade. As lagartas foram alimentadas diariamente com *P. suberosa* e mantidas a 25°C.

As pupas da borboleta *H. erato phyllis* foram categorizadas de acordo com o método descrito em Ferreira *et al.* (2006).

Para analisar a influência do fotoperíodo nesta espécie, os ovos, logo após serem acondicionados em seus potes plásticos, foram submetidos a diferentes tratamentos de quantidades de horas de luz, permanecendo nesta situação até o adulto emergir. Cada prole teve seus ovos distribuídos por todos os tratamentos. Os seguintes tratamentos de fotoperíodos foram utilizados: 14L:10E, 12L:12E, 11L:13E, 9L:15E e 24L:00E. Os três

primeiros foram escolhidos por simularem durações de horas de luz em Porto Alegre (Estado do Rio Grande do Sul – Brasil), sendo que 12hs de luz representa o equinócio de primavera e o equinócio de outono, e 14hs de luz representa o solstício de verão (Silveira, 2000). A utilização do fotoperíodo 9L:15E teve o objetivo de fornecer uma situação atípica de luz para a espécie no Estado do Rio Grande do Sul. O tratamento 24L:00E é utilizado por nosso grupo de pesquisa como padrão de horas de luz e foi utilizado como controle em nossas análises.

A análise estatística dos dados foi feita através da análise da variância uni e bifatorial, utilizando o teste de Tukey como teste *post hoc*.

Resultados

A influência do fotoperíodo sobre a coloração da pupa em *H. erato phyllis* foi testada a partir da análise de duas irmandades (prole 1 e 2) e uma prole que se constituiu a partir da oviposição de várias fêmeas (prole 3), sendo as três proles submetidas aos cinco tratamentos de fotoperíodo. A distribuição dos escores por tratamento e por prole está na tabela 1. A análise da variância bifatorial (Tabela 2) não indica uma diferença significativa para as proles, embora esteja no limiar da significância ($p = 0,069$). Os tratamentos também não mostram diferença entre si sobre o efeito na cor da pupa ($p = 0,280$), assim como também não foi significativa a interação entre prole e tratamento ($p = 0,233$).

A fim de analisar apenas a dependência da cor da pupa unicamente em relação aos fotoperíodos, efetuou-se uma análise da variância unifatorial (Tabela 3). O resultado obtido ($n = 346$ exúvias) entre os tratamentos, mostra uma diferença significativa ($p = 0,047$) entre os fotoperíodos. O teste de Tukey aponta uma única diferença, no limiar da significância,

entre os fotoperíodos 12L:12E e 14L:10E ($p = 0,059$). A distribuição dos escores por tratamentos e por proles é mostrada na figura 1.

A fim de verificar se o valor, no limiar da significância, obtido pela análise da variância unifatorial realmente reflete uma diferença entre os fotoperíodos, ou se este se deve a diferenças genéticas comparamos as três proles, porém, destas somente as pupas que se formaram sob o tratamento 24L:00E, com um conjunto de 22 proles (a partir de agora denominado de conjunto) que haviam sido criadas sob o mesmo fotoperíodo e que tal como a prole 3, também representa a oviposição de várias fêmeas. A comparação entre as três proles, mais o conjunto foi feita através da análise da variância unifatorial (Tabela 4). O resultado obtido mostra uma diferença significativa ($p = 0,001$). O teste de Tukey indica que o conjunto difere das proles 1 e 2 e não difere da prole 3 ($p = 0,013$; $0,020$ e $0,503$; respectivamente). A figura 2 mostra a distribuição dos escores para esta comparação.

Discussão

Os tratamentos de fotoperíodos analisados neste trabalho indicam que estes não afetam a coloração da pupa em *H. erato phyllis*. Os resultados obtidos pela análise da variância bifatorial (Tabela 2), que compara a cor da pupa dentro das proles e dentro de cada fotoperíodo, mostraram que os efeitos dos tratamentos não influenciaram na determinação da cor da pupa.

A diferença entre os tratamentos apontados pela análise da variância unifatorial, quando examinado pelo teste de Tukey mostra uma diferença, próxima a significância, entre os fotoperíodos 12L:12E e 14L:10E. Visto que esta foi a única diferença entre os

tratamentos, uma segunda análise da variância unifatorial foi feita, porém considerando apenas o tratamento controle (24L:00E) das três proles e incluindo um conjunto de outras 22 proles, também criadas sob este último tratamento. Os resultados mostrados na figura 2 evidenciam dois agrupamentos (um deles formado pelas proles 1 e 2 e o outro, pelas proles 3 e “conjunto”) que diferem nas médias dos escores. Caso fosse o fotoperíodo um determinante ambiental da cor da pupa, como o que ocorre em algumas espécies das famílias Pieridae, Papilionidae e Lycaenidae (Smith, 1978; Smith, 1980; Hazel & West, 1983; Usui *et al.*, 2004), seria esperado que esta diferença não se manifestasse ou fosse reduzida. O conjunto de 22 proles, baseado nas diversas origens de suas fêmeas fundadoras, pode ser comparado a prole 3 no que se refere a variabilidade genética, pois ambos representam as características genóticas de diversas irmandades. Diferentemente, as proles 1 e 2, representam, cada uma, as características genóticas de um casal. Desta forma, é plausível concluir, que as diferenças observadas, podem ser consideradas como genéticas e não devido à influência do fotoperíodo.

A mudança na quantidade de horas de luz está associada a mudanças de estações climáticas, as quais, além da quantidade de luz, também trazem mudanças de temperatura. A interação entre fotoperíodo e temperatura não foi testada por nós devido aos resultados fornecidos por um teste piloto, onde metade de uma irmandade foi submetida ao tratamento controle enquanto que a outra metade foi submetida a um fotoperíodo de inverno (em torno de 11hs de luz) e temperatura de inverno (média de 16°C). As médias para a cor da pupa foram $3,90 \pm 0,55$ (controle) e $3,88 \pm 0,49$ (condições de inverno). Esta situação contrasta com os efeitos observados em *Lycaena phlaeas daimio* que aumenta a frequência de pupas escuras conforme diminui a temperatura e sob efeito do fotoperíodo 10L:14E (Usui *et al.*, 2004). Hazel (2002) considerou como polifenismo, o efeito das

condições de luz e temperatura de outono, modificando o fenótipo de claro para escuro em lagartas de *Papilio polyxenes*. Porém, a falta de influência do fotoperíodo na cor das pupas em *H. erato phyllis*, é compartilhada por outras espécies, como por exemplo, *Battus philenor* e *Eurytides marcellus* (Hazel & West, 1979; Hazel & West, 1983) que, assim como *H. erato phyllis*, tem a cor de sua pupa influenciada principalmente pela cor de fundo do local escolhido para fazer a muda para pupa (Hazel & West, 1979; Hazel & West, 1982; West & Hazel, 1985; Ferreira *et al.*, 2006). Possivelmente o fotoperíodo não é um fator ambiental importante na determinação da cor da pupa nesta latitude devido às pequenas diferenças entre as estações do ano.

Referências Bibliográficas:

- Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.
- Hazel WN (2002) The environmental and genetic control of seasonal polyphenism in larval color and its adaptive significance in a swallowtail butterfly. *Evolution* 56: 342-348.
- Hazel WN & West DA (1979) Environmental control of pupal colour in swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Battus philenor* (L.) and *Papilio polyxenes* Fabr. *Ecological Entomology* 4: 393-400.
- Hazel WN & West DA (1982) Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies as a threshold trait: selection in *Eurytides marcellus* (Cramer). *Heredity* 49: 295-301.
- Hazel WN & West DA (1983) The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. *Ecological Entomology* 8: 37-42.
- Périco E & Araújo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Evolución Biológica*. 5: 59 – 74.

- Silveira, FL (2000) O movimento anual do sol em Porto Alegre. Na [html: http://astro.if.ufrgs.br/dia.htm](http://astro.if.ufrgs.br/dia.htm) .
- Smith AG (1978) Environmental factors influencing pupal colour determination in Lepidoptera. I. Experiments with *Papilio polytes*, *Papilio demoleus* and *Papilio polyxenes*. Proceedings of The Royal Society of London B 200: 295-329.
- Smith AG (1980) Environmental factors influencing pupal colour determination in Lepidoptera. II. Experiments with *Pieris rapae*, *Pieris napi* and *Pieris brassicae*. Proceedings of The Royal Society of London 207: 163-186.
- Usui Y, Yamanaka A, Islam ATMF, Shahjahan R & Endo K (2004) Photoperiod- and temperature-dependent regulation of pupal beige/black polymorphism in the small copper butterfly, *Lycaena phlaeas daimio* Seitz. Zoological Science 21: 835-839.
- West DA & Hazel WN (1985) Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies: timing of the sensitive period and environmental control. Physiological Entomology 10: 113-119.

Tabela 1: Número de exúvias em cada escore para a cor da pupa divididos por prole em cada tratamento de fotoperíodo.

Fotoperíodo	Prole	Escore para cor da pupa			
		2	3	4	5
9L:15E	1	0	15	4	0
	2	3	17	2	0
	3	1	20	6	0
Total		4	52	12	0
11L:13E	1	1	15	2	1
	2	3	16	3	0
	3	0	23	7	0
Total		4	54	12	1
12L:12E	1	0	19	1	0
	2	0	21	0	1
	3	0	29	0	0
Total		0	69	1	1
14L:10E	1	0	16	5	0
	2	1	19	4	0
	3	0	18	8	1
Total		1	53	17	1
24L:00E	1	0	17	1	0
	2	0	19	3	0
	3	1	16	9	2
Total		1	52	12	2

Tabela 2: Resultado da análise da variância bifatorial, para as proles 1, 2 e 3 considerando a cor da pupa como variável dependente da prole e do fotoperíodo.

Causa da Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Prole	2,097	2	1,048	3,808	0,069
Fotoperíodo	1,684	4	0,421	1,533	0,280
Interação (PxS)	2,203	8	0,275	1,318	0,233

Tabela 3: Resultado da análise da variância unifatorial, para as proles 1, 2 e 3 considerando a cor da pupa como variável dependente do fotoperíodo.

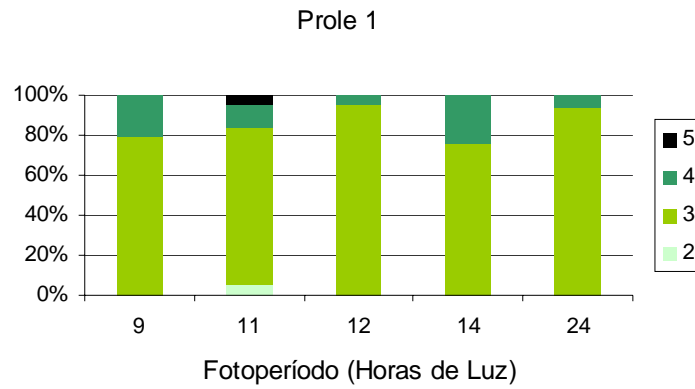
	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Entre Tratamentos	2,098	4	0,525	2,437	0,047
Dentro dos Tratamentos	74,259	345	0,215		
Total	76,357	349			

Tabela 4: Resultado da análise da variância unifatorial, para o tratamento 24L:00E entre as proles 1, 2 , 3 e Conjunto considerando a cor da pupa como variável dependente das proles.

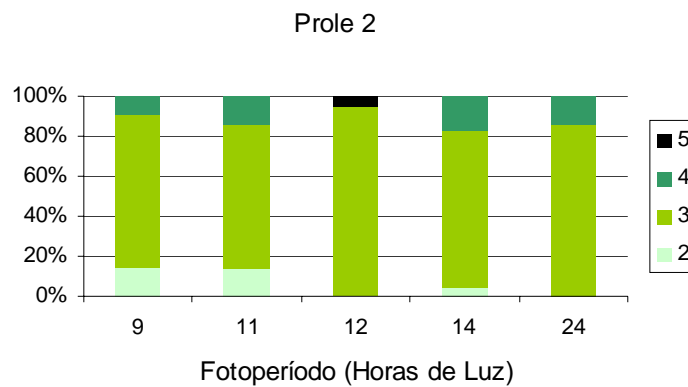
	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>
Entre Proles	12,509	3	4,170	6,262	0,001
Dentro das Proles	599,296	900	0,666		
Total	611,804	903			

Figura 1: Distribuição dos escores, em porcentagem, para a cor da pupa entre os tratamentos de fotoperíodos dentro de cada prole.

a)



b)



c)

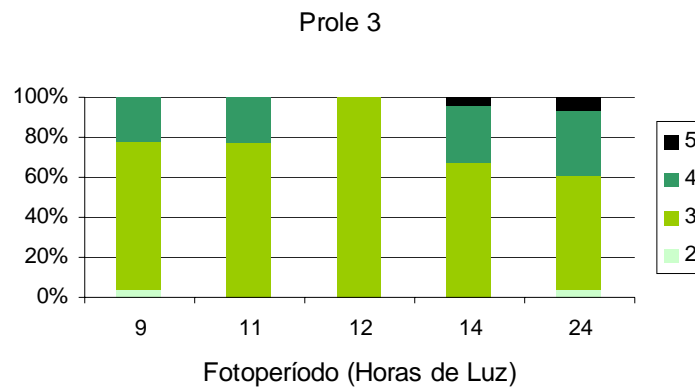
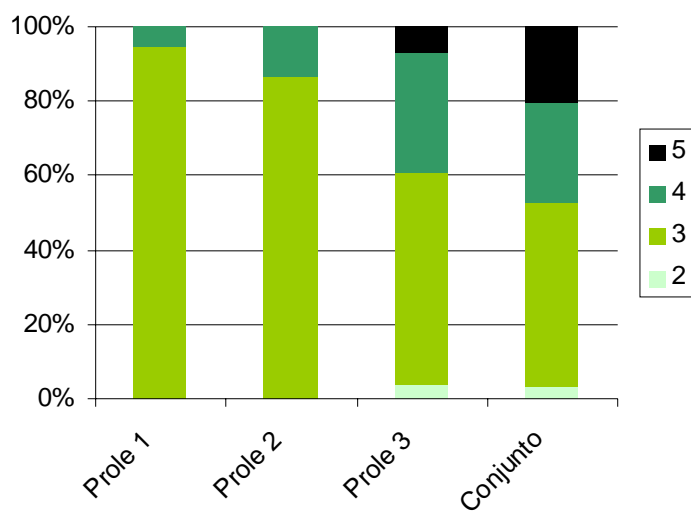


Figura 2: Distribuição dos escores, em porcentagem, para a cor da pupa para as proles 1, 2, 3 e conjunto submetidas ao tratamento fotoperíodo de 24L:00E.



CAPÍTULO 4

**Estimativas sobre o risco de predação em pupas de *Heliconius erato phyllis*
(Lepidoptera; Nymphalidae)**

Este manuscrito será submetido ao periódico *Biotropica*

**Estimativas sobre o risco de predação em pupas de *Heliconius erato phyllis*
(Lepidoptera; Nymphalidae)**

Adriano Andrejew Ferreira e Aldo Mellender de Araújo

Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras-chave: Adaptação, Cor da Pupa, Formigas, Modulação Fenotípica, Sobrevivência

Resumo

A sobrevivência dos estágios imaturos em Lepidoptera certamente está associada a adaptações específicas para cada estágio. Assim a coloração da pupa resultando de uma interação entre o genótipo e o ambiente representaria uma maior chance de sobrevivência. A adaptação em campo, conferida pela camuflagem entre a cor da pupa e o fundo na qual está inserida, até o presente momento, foi estudada principalmente nas famílias Papilionidae e Pieridae. Neste trabalho avaliamos a sobrevivência de pupas em campo em *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae) uma espécie Neotropical. As pupas que nesta espécie apresentam uma variação de um padrão claro até um padrão escuro (preto), foram implantadas em dois locais. Em cada local foram divididas em dois níveis diferentes de altura. Em cada nível as pupas foram colocadas aos pares, sendo uma considerada críptica e a outra não-críptica. Os fenótipos claro e escuro também foram avaliados em relação à sobrevivência. Os resultados encontrados indicam uma relação direta da sobrevivência com o nível de altura em que as pupas foram inseridas. A camuflagem e a cor não se mostraram significantes para a sobrevivência da pupa em campo. Pupas implantadas próximo ao solo têm uma chance entre 8 e 13 vezes maior de serem predadas do que pupas acima de 1,0 metro de altura. Estes resultados foram vinculados ao tipo de predador observado em campo: formigas. Três espécies foram observadas trabalhando na remoção de pupas. Em um primeiro momento conclui-se que, para esta espécie de borboleta, a vantagem para sobrevivência das pupas estaria relacionada à escolha de um local afastado do solo, bem como o tempo de desenvolvimento e a densidade populacional.

Introdução

A sobrevivência dos estágios imaturos em Lepidoptera certamente está associada a adaptações específicas para cada estágio. No estágio pupal onde a vulnerabilidade acentua-se pela imobilidade, a camuflagem com o meio, através da cor, é considerada um importante mecanismo de defesa (Hazel, 1995). A modificação da coloração conforme o local em que se situa, apresentada por pupas de várias espécies de borboletas, resulta da plasticidade fenotípica. A plasticidade fenotípica na coloração das pupas em Lepidoptera, principalmente nas famílias Papilionidae, Pieridae e Nymphalidae vêm sendo estudada há algumas décadas (Hidaka *et al.*, 1959; Baker, 1970; Clarke & Sheppard, 1972; Hazel & West, 1983; Starnecker, 1996; Ferreira *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007), bem como sua função adaptativa (Baker, 1970; Wiklund, 1975; Sims & Shapiro, 1983; Hazel *et al.*, 1987 e Hazel *et al.*, 1998). Estes últimos trabalhos citados, que avaliam a adaptação da pupa através da sua coloração, em geral concluem que a plasticidade fornece proteção à crisálida e por conseqüência aumenta as chances de sobrevivência do indivíduo para chegar ao estágio de imago.

Heliconius erato phyllis, Cramer (Nymphalidae) é uma subespécie amplamente estudada que habita principalmente o sul, sudeste e o leste do Brasil. A coloração da pupa, nesta borboleta, apresenta uma variação contínua desde um padrão bem claro até um padrão bem escuro (preto). Ferreira *et al.*, 2006, mostraram que a herdabilidade do fenótipo da cor da pupa, quando os pais e a prole são considerados, está em torno de 50 % (este valor pode ser menor quando apenas a fêmea e sua prole são considerados); por outro lado, estes autores mostraram que o grau de melanização das pupas é um caráter fortemente influenciado pelo ambiente. Desta forma concluem que esta variação é o

resultado da interação entre o genótipo e o ambiente, conferindo, também, ao indivíduo um caráter plástico para a coloração da pupa.

O presente trabalho avalia o impacto da predação sobre as pupas de *H. erato phyllis*, em dois locais onde habitualmente ocorrem populações naturais desta borboleta. O objetivo do trabalho foi investigar o papel de algumas variáveis, tais como o grau de melanização das pupas, seu grau de camuflagem em relação ao ambiente circundante e da distância de posicionamento da pupa em relação ao solo, quanto ao risco de predação.

Material e Métodos

As pupas utilizadas neste estudo eram provenientes de ovos coletados em insetário (2m x 2m x 3,5m), utilizados para criação de *H. erato phyllis*. Em algumas ocasiões, quando foi necessário incrementar a quantidade de pupas para os experimentos, fêmeas foram coletadas na natureza, em locais próximos a Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os experimentos foram realizados em dois verões consecutivos, 2005/2006 e 2006/2007.

Criação dos Animais

Os ovos foram coletados diariamente e acondicionados individualmente em potes plásticos, translúcidos, com a tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro). O fundo do pote foi coberto por um papel absorvente branco, para retenção de umidade. As lagartas foram alimentadas diariamente com *Passiflora suberosa* e mantidas a 25°C com luz permanente (24hs). Um tratamento alternativo foi utilizado com a intenção de incrementar a quantidade de pupas escuras. No início do 5º ínstar as lagartas eram

transferidas para potes recobertos externamente por papel preto e cuja tampa era recoberta em sua parte interna. Em ambos os tratamentos as lagartas empuparam dentro do pote.

Local de Estudo

Foram utilizadas duas áreas neste estudo, ambas localizadas na periferia de Porto Alegre: a) Estação de Fitotecnia de Águas Belas - FEPAGRO - Viamão, RS - 30°02'17.18'' S - 51°01'10.48'' W (aqui designada como ABE). Neste local situa-se uma mata de eucaliptos na qual há uma grande quantidade de *P. suberosa* e, também, uma mata secundária, separada da primeira por uma pequena estrada, na qual também há *P. suberosa*, porém em menor quantidade. b) Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) - campus universitário da UFRGS - Porto Alegre, RS - 30°04'29.89'' S - 51°07'00.70'' W. Neste local, um caminho, que contorna o instituto indicado acima, separa um resquício de mata secundária e a cerca deste instituto, a qual possui vários arbustos na sua extensão. As pupas foram implantadas neste caminho. A vegetação é secundária e contém pelo menos cinco espécies de passifloráceas: *P. suberosa*, *P. misera*, *P. caerulea*, *P. elegans* e *P. alata*; as duas primeiras espécies são hospedeiras preferenciais de *H. erato phyllis* (Périco e Araújo, 1991). *P. suberosa*, por outro lado, está presente em abundância nas duas localidades. A distância linear entre os dois locais de estudo é de cerca de 10 km.

Implantação das Pupas

A preparação para a implantação das pupas na natureza ocorreu em laboratório. Após serem retiradas dos potes (com o cuidado de preservar a seda de fixação, presente junto ao cremaster) foram sexadas e categorizadas em relação à cor (a partir de uma escala crescente de melanização, descrita em Ferreira et al., 2006, separou-se dois grupos, pupas

claras e pupas escuras). Uma linha foi amarrada na seda para a posterior fixação no substrato.

Um total de 200 pupas foi implantado na natureza, 100 em Águas Belas (ABE) e 100 no Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH). Dentro de cada local as 100 pupas foram divididas em dois níveis de altura: Altura 1 (A1) - pupas próximas ao solo, até 30 cm e, Altura 2 (A2) - pupas posicionadas entre 1 e 1,70m. Para cada nível de altura, foram posicionadas 50 pupas. Em cada nível as 50 pupas foram implantadas aos pares, sendo uma camuflada (críptica) e outra não-camuflada (conspícua) em relação ao local de implantação (Figura 1). A distância entre os pares foi aleatória (no mínimo 1m), porém sempre maior que a distância dentro de um par, a qual variou entre 10 e 50 cm. Em cada conjunto de 50 pupas em cada nível, 25 eram de fenótipo escuro e 25 de fenótipo claro. A distribuição dos fenótipos deu-se de forma independente da distribuição camufladas/não-camufladas, isto é, o número de pupas escuras camufladas não foi necessariamente igual ao número de pupas claras camufladas. Desta forma, com o desenho experimental acima descrito, foi testada a intensidade da predação por nível de altura e, em cada nível, o efeito de estar ou não camuflada e finalmente, o efeito dos fenótipos claro e escuro.

Após a fixação de cada pupa, o local era marcado. Uma hora após o término da implantação das pupas seguia-se a primeira vistoria. A partir deste momento, nos dias subseqüentes, duas inspeções eram feitas, uma no início da manhã (8 h) e outra ao final da tarde (18 h). As ocorrências entre 8 e 18 horas foram consideradas como “predação diurna”, enquanto que aquelas entre as 18 e às 8 horas da manhã seguinte como “predação noturna”. As inspeções foram diárias e seguiram até que a última pupa fosse predada ou dela emergisse um adulto.

Uma vez implantadas na natureza, as pupas tiveram seu destino categorizado entre “predadas” e “não-predadas”. Dentro destas categorias foram feitas subdivisões, as quais estão listadas na Tabela 1. Todos os resíduos das pupas predadas foram coletados e conservados em álcool 70% para exame posterior.

Testes Estatísticos

A análise dos dados obtidos em campo foi feita através da hipótese de independência mútua entre as variáveis através de uma tabela de contingência tridimensional, onde a frequência esperada calculada é comparada com a frequência observada por meio do teste estatístico χ^2 conforme Everitt (1977). Testou-se a relação da predação com a camuflagem e a altura, a relação da predação com o fenótipo e a altura e, a relação da predação com o fenótipo e a camuflagem.

Resultados

A tabela 1 apresenta um resumo da situação final dos testes ocorridos em campo. Para as pupas *não predadas* considerou-se dois desfechos: a) a emergência do adulto ou b) morte não relacionada a predadores. Esta última possibilidade refere-se às pupas que morreram por causas desconhecidas e permaneceram no local de implantação. Para as pupas *predadas* foram considerados três desfechos a partir da constatação da ausência, ou dano na pupa.

A tabela 1 mostra que das 50 pupas implantadas na altura 1 em ABE 26% não foram predadas (13/50), enquanto que para o IPH, nesta mesma altura, o valor foi de 41% (21/50). Para a altura 2 os valores correspondentes foram significativamente menores,

sendo em ABE 82% das pupas (41/50) não predadas com um valor semelhante sendo encontrado para o IPH, 86% (43/50). Por outro lado, de um modo geral, Águas Belas apresentou valores maiores de predação para os dois níveis de altura: 74% das pupas colocadas na natureza para altura 1 e 18% para altura 2, contra 58% (A1) e 14% (A2) para as pupas distribuídas no IPH (Figura 2).

Entre os indivíduos predados o fato mais freqüente foi a remoção total ou quase total da pupa (item 2a, Tabela 1): 91% (42/46) das ocorrências em ABE e 89% (32/36) no IPH, sendo em ambos locais a maioria ocorrida próximo ao solo (A1). Dentre estas, em apenas dois casos houve a remoção parcial da pupa (item 2b, Tabela 1), sendo o restante removido em sua totalidade. A ocorrência de predação em torno de 1 metro de altura (A2) foram menos freqüentes, porém apresentam uma nova categoria de predação: pupas com furo ou buraco (Figura 3). Entre as pupas que foram removidas parcialmente (Tabela 1, 2b; Figura 4) três delas não estavam camufladas enquanto as outras duas foram consideradas camufladas.

Os resultados encontrados para as duas localidades, ABE e IPH, indicam que a predação independe da camuflagem, mas está diretamente relacionada com o nível de altura em que a pupa foi colocada (Tabelas 2 e 3). Sempre que a comparação Predação x Camuflagem foi feita, os resultados quanto ao teste do qui-quadrado mostraram-se não significativos. Resultado semelhante foi obtido quando a análise da predação envolveu os fenótipos claro/escuro e o nível de altura (Tabelas 4 e 5). A predação da pupa não está relacionada com a sua cor, mas sim com o nível de altura no qual ela foi inserida. Uma análise complementar foi feita, comparando-se fenótipo e camuflagem com relação à predação, mantendo-se a altura constante, isto é, analisando-se os resultados para cada altura em particular onde as pupas foram posicionadas. Para ABE, altura 1: $\chi^2 = 1,14$; 0,80

$< p < 0,90$; e altura 2: $\chi^2 = 4,23$; $0,30 < p < 0,50$. Para o IPH, altura 1: $\chi^2 = 6,44$; $0,10 < p < ,20$; e altura 2: $\chi^2 = 5,82$; $0,20 < p < 0,30$ (Para todos valores $gl = 4$). Nenhuma das comparações resultou significativa, confirmando os resultados anteriores e indicando que a predação independe do fenótipo e da camuflagem.

Uma vez que a altura de posicionamento das pupas mostrou-se altamente relevante para a sobrevivência das mesmas, estimou-se o risco de predação, sob a forma de *odds ratio* (OR) para cada um dos níveis de altura de implantação das pupas, nos dois locais. Em ABE o risco de pupas próximas ao solo serem predadas foi 13 vezes maior que as pupas implantadas entre 1 e 1,7m de altura (OR = 12,97; Intervalo de Confiança 95% : 4,53 – 38,46). No IPH este valor é menor, mas ainda expressivo: pupas próximas ao solo têm 8,5 vezes mais de chance de serem predadas do que pupas entre 1 e 1,7m de altura (OR = 8,48; IC 95%: 2,92 – 25,56).

Com base nas observações diárias para cada local, curvas de sobrevivência foram estabelecidas (Figura 2): tanto em um local como no outro, a atividade de predação mostrou-se mais intensa nas primeiras 24hs, especialmente no caso do nível A1 de altura (Figura 2 a); o nível de altura A2 não apresentou esta tendência (Figura 2 b). Uma comparação entre as curvas, para cada altura de implantação das pupas, mostrou que elas são significativamente diferentes (teste de Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,70$; $p < 0,01$, para A1 e $D = 0,40$; $p = 0,05$, para A2).

As observações realizadas diariamente nas pupas implantadas, mostraram que as formigas devem estar entre os principais predadores das mesmas. As figuras 5 e 6 correspondem a registros fotográficos de remoção ou tentativa de remoção das pupas realizadas pela espécie *Pachycondyla striata* (Ponerinae), uma formiga de tamanho

avantajado, com cerca de 2/3 do tamanho da pupa. Outras espécies de formiga encontradas removendo as pupas e/ou caminhando sobre as mesmas, estão indicadas na Tabela 6.

Outras observações, porém sem registro fotográfico, revelaram que mais duas espécies de formigas removeram pupas: *Odontomachus chelifer* (Ponerinae), onde um grupo de indivíduos efetuou a remoção completa e o transporte da pupa, provavelmente para seu ninho. Por outro lado, *Crematogaster* sp.1 (Myrmicinae) também através de um grupo de indivíduos, retirava pequenos pedaços da pupa até sua remoção quase completa, permanecendo apenas o último segmento do abdômen. Os registros de predação para *P. striata* e *O. chelifer* restringem-se a pupas próximas ao solo. Enquanto que para *Crematogaster* sp.1, em mais de uma oportunidade foi observada a remoção, também, entre 1 e 1,7m. Estas três espécies de formigas foram encontradas em ambos locais de implantação das pupas. A presença de uma quarta espécie, *Solenopsis* sp., foi registrada em fotografia (Figura 4), em uma pupa colocada na altura 2 em ABE. Porém, apenas dois indivíduos foram vistos sobre esta pupa que foi considerada predada, apresentando remoção parcial. Diferente dos casos citados anteriormente consideramos que esta espécie de formiga não estava relacionada com a predação da pupa fotografada, devido ao baixo número de indivíduos encontrados sobre e nas proximidades do local de implantação.

Discussão

Um fenótipo variável, tal como a coloração da pupa em lepidópteros, a qual pode se tornar críptica em seu local de empupação, em princípio será considerado adaptativo. Porém West-Eberhard (2003, p. 33) define que “plasticidade é a habilidade de um organismo reagir a um estímulo ambiental interno ou externo através de uma mudança na

forma, estado, movimento ou taxa de atividade. Ela pode ser ou não adaptativa (uma consequência de seleção prévia).” A coloração da pupa em *Heliconius erato phyllis*, considerado um fenótipo com variação contínua, que responde a influência ambiental (Ferreira et al., 2006), permitiu-nos testar a hipótese de adaptação ao meio. Contudo, os resultados aqui apresentados sugerem que a camuflagem, tanto de pupas claras como das escuras, não confere vantagem para a sobrevivência das pupas desta espécie. Resultados semelhantes foram encontrados para alguns papilionídeos. *Battus philenor*, uma espécie onde a pupa pode ser verde ou marrom, não mostrou uma diferença significativa para predação quando foram comparadas pupas crípticas com não-crípticas, conforme o tipo de substrato escolhido para empupar (Sims & Shapiro, 1983). Para *Papilio machaon* Wiklund (1975) encontrou que pupas crípticas, na geração de verão, têm maior sobrevivência que pupas não-crípticas, porém esta diferença não foi significativa. A mesma comparação feita para a geração de inverno mostrou que a coloração críptica não confere vantagem para a sobrevivência. Em *Papilio polyxenes*, os resultados indicaram que apenas pupas verdes em locais com fundo verde, 40 cm acima do solo, têm uma sobrevivência diferencial devido à sua camuflagem; outras combinações entre a cor da pupa e a cor do fundo não se mostraram efetivas na proteção contra a predação (Hazel et al., 1998). Mesmo assim, os autores dos trabalhos citados acima consideram o polimorfismo para a coloração da pupa, nas respectivas espécies, como adaptativo.

No presente trabalho, constatou-se que o fator altura foi preponderante na sobrevivência das pupas de *H. erato phyllis*: nas duas localidades testadas, onde a ocorrência da espécie é comum, o fator “maior distância do solo” se mostrou vantajoso uma vez que pupas próximas ao solo apresentaram um risco entre 8 e 13 vezes maior de serem predadas. Este fato está diretamente relacionado com o principal predador de pupas

observado no presente trabalho, as formigas. As três espécies de formigas aqui referidas, ao finalizarem seu trabalho deixam pouco ou nenhum vestígio da pupa. A falta de vestígios foi relatada por West e Hazel (1982) com pupas de *Battus philenor*, porém a causa do desaparecimento não foi discutida; e por White (1986) ao avaliar a mortalidade em campo de pupas de *Euphydryas editha bayensis*. Em um período de estudo White encontrou a taxa de 42% de desaparecimentos sem vestígios.

Porém, a possibilidade de formigas como predadoras de pupas não foi levantada nestes dois trabalhos, assim como em outros que abordam a sobrevivência da pupa em campo. Baker (1970) constata apenas predação por pássaros em pupas de *Pieris rapae* e *P. brassicae*. Wiklund (1975) conclui que para pupas de *Papilio machaon* os únicos predadores seriam pássaros e pequenos mamíferos. As pupas de *Battus philenor* também foram testadas em campo por Sims & Shapiro (1983) onde os predadores não foram determinados; os autores supõem a predação por pássaros e pequenos mamíferos baseados nas pupas que foram encontradas danificadas. Hazel *et al.* (1987) e Hazel *et al.* (1998) avaliam a sobrevivência, porém sem inferir sobre predadores.

A intensidade de predação verificada próxima ao solo nas primeiras 24 horas (Figura 2 a) se ajusta à forma de forrageio de *P. striata* e *O. chelifer* que devido à alta concentração de pupas no início do experimento teriam uma maior probabilidade de encontrar suas presas. *Crematogaster* sp. 1 constrói seu ninho em árvores ou arbustos e, geralmente, restringe-se a estes locais em busca de alimento; é possível, portanto, que algumas das pupas tenham sido implantadas coincidentemente em locais onde havia tais ninhos. Com base nos resultados do presente trabalho pode-se concluir que, na maioria dos casos, onde não se encontram restos ou apenas o último segmento do abdômen as pupas foram predadas por formigas. Nos outros casos apontados podemos apenas especular sobre

os predadores, visto o que pequeno número de ocorrências não permite uma avaliação mais criteriosa. Destes, os ocorridos próximos ao solo poderiam ser efetuados por pequenos mamíferos ou répteis e para os casos de predação ocorridas entre 1 e 1,7m esta poderia ser feita por aves.

A diferença entre a intensidade de predação verificada nas duas áreas de estudo (Figura 2) é de difícil explicação. É possível que ela esteja relacionada com a maior ação antrópica verificada no IPH, um local atualmente não sujeito aos cuidados verificados em ABE, o qual é um local para pesquisa e mostra-se relativamente mais preservado e conseqüentemente reservado da ação antrópica. Outro fator de ordem macroecológica que se mostrou diferente entre os dois locais, foi a maior intensidade de precipitação pluviométrica no local ABE (informações compiladas a partir das observações de campo); a relação entre este fato e a maior magnitude da predação neste local ainda é uma incógnita.

Além da proteção pela altura, indicada pelos resultados deste trabalho, outros fatores podem ser considerados como vantajosos para a sobrevivência da pupa. Um deles seria o tempo de permanência no estágio de pupa (aproximadamente 8 dias a 25°C); quanto menor o tempo de exposição menor será a probabilidade de predação. Ao contrário disso, quanto maior a duração do período de pupa, maior o risco, tal como o registrado para pupas da espécie *Papilio polyxenes*; ao permanecer neste estágio durante todo o inverno, nenhuma sobreviveu nos experimentos de Hazel *et al.* (1987); mais ainda, 80% delas desapareceram nas primeiras sete semanas.

Outro fator que aumentaria as chances de sobrevivência das pupas de *H. erato phyllis*, em condições naturais, seria sua baixa densidade; Romanovsky *et al* (1985) estimaram em cerca de 80 % o desaparecimento de lagartas de primeiro e segundo instares

desta espécie em observações que não envolveram a manipulação dos estágios imaturos. Desta forma, considerando-se a mortalidade total na fase pré-adulta, a densidade de pupas não deve ser usualmente alta, mesmo nos períodos de alta densidade de adultos. Os experimentos aqui relatados proporcionaram uma densidade de pupas em campo extremamente alta em relação ao esperado pela baixa sobrevivência de imaturos, o que possivelmente teve reflexos na quantificação da intensidade da predação. Portanto, um tempo de metamorfose relativamente rápido, associado à baixa densidade e a escolha de um local relativamente afastado do solo, constituiriam fatores capazes de aumentar a sobrevivência das pupas em *H. erato phyllis*.

Referências Bibliográficas

- Baker RR (1970) Bird predation as a selective pressure on the immature stages of the cabbage butterflies, *Pieris rapae* and *P. brassicae*. *Journal of Zoology*, London 152: 43-59.
- Clarke CA, & Sheppard PM (1972) Genetic and environmental factors influencing pupal colour in the swallowtail butterflies *Battus philenor* L. and *Papilio polytes* L. *Journal of Entomology* 46: 123-133.
- Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.
- Everitt BS (1977) *The Analysis of Contingency Tables*. London Chapman and Hall, New York, USA.
- Hazel WN (1995) The causes and evolution of phenotypic plasticity in pupal color in swallowtail butterflies. *Swallowtail Butterflies: their Ecology and Evolutionary Biology* (ed. by J. M. Scriber, Y. Tsubaki and R. C. Lederhouse), pp. 205-210. Scientific Publishers, Gainesville, Florida.
- Hazel WN & West DA (1983) The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. *Ecological Entomology* 8: 37-42.

- Hazel WN, Brandt R & Grantham T (1987) Genetic variability and phenotypic plasticity in pupal colour and its adaptive significance in the swallowtail butterfly *Papilio polyxenes*. *Heredity* 59: 449-455.
- Hazel W, Ante S & Stringfellow B (1998) The evolution of environmental-cued pupal colour in swallowtail butterflies: natural selection for pupation site and pupal colour. *Ecological Entomology*. 23: 41 – 44.
- Hidaka T, Kimura T & Onosaka M (1959) Experiments on the protective coloration of pupae of the swallowtail, *Papilio xuthus* L. *Dobutsukaku zasshi* 68: 222-226.
- Jones M, Rakes L, Yochum M, Dunn G, Wurster S, Kinney K & Hazel W (2007) The proximate control of pupal color in swallowtail butterflies: implications for the evolution of environmentally cued pupal color in butterflies (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Insect Physiology* 53: 40-46.
- Périco E & Araújo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Evolución Biológica*. 5: 59 – 74.
- Romanovsky HP, Gus R & Araújo AM (1985) Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidop.,; Nymph.). III. Population size, preadult mortality, adult resources and polymorphism in natural populations. *Revista Brasileira de Biologia* 45(4): 563-569.
- Sims SR & Shapiro AM (1983) Pupal colour dimorphism in california *Battus philenor* (L.) (Papilionidae): mortality factors and selective advantage. *Journal of The Lepidopterists' Society* 37: 236-243.
- Starnecker G (1996). Colour preference for pupation sites of the butterfly larvae *Inachis io* and the significance of the pupal melanization reducing factors. *Naturwissenschaften* 83: 474-476.
- West DA & Hazel WN (1982) An experimental test of natural selection for pupation site in swallowtail butterflies. *Evolution* 36: 152-159.
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, USA.
- White RR (1986) Pupal mortality in the bay checkerspot butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). *The Journal of Research on the Lepidoptera* 25(1): 52-62.

Wiklund C (1975). Pupal colour polymorphism in *Papilio machaon* L. and the survival in the field of cryptic and non-cryptic pupae. *Trans.Royal Entomol. Soc. London* 127: 73-84.

Tabela 1: Resumo, em números absolutos, quanto ao destino das pupas implantadas em duas localidades (ABE e IPH), onde foram testadas quanto ao risco de predação em dois níveis de altura A1 (até 30cm do solo) e A2 (entre 1 e 1,70m).

<i>Situação</i>	<i>Desfecho da Situação</i>	ABE		IPH	
		A1	A2	A1	A2
1) Não Predadas	a) emergiu	13	40	17	43
	b) morte não relacionada a predadores	0	1	4	0
2) Predadas	a) sem restos ou o segmento final do abdômen	37	5	27	5
	b) remoção parcial, restando metade da pupa	0	1	2	2
	c) pupa com furo ou buraco	0	3	0	0

Tabela 2: Teste de independência mútua através de tabela de contingência tridimensional para a predação de pupas implantadas em Águas Belas (ABE), considerando a camuflagem em relação ao nível do solo. Os números representam a quantidade de pupas resultante em cada situação.

		<i>Nível em Relação ao Solo</i>				Total
		A1		A2		
<i>Camuflagem</i>		Sim	Não	Sim	Não	
<i>Predação</i>	Sim	19	18	4	5	47
	Não	6	7	21	20	53
Total		25	25	25	25	100

P x A = Predação x Altura; P x C = Predação x Camuflagem.

$\chi^2_{\text{Total}} = 31,72$; $p = 0,001$; $gl = 4$. P x A: $\chi^2 = 31,72$; $p = 0,001$; $gl = 3$. P x C: $\chi^2 = 0,24$; $p = 0,971$; $gl = 3$.

Tabela 3: Teste de independência mútua através de tabela de contingência tridimensional para a predação de pupas implantadas no IPH, considerando a camuflagem em relação ao nível do solo. Os números representam a quantidade de pupas resultante em cada situação.

		<i>Nível em Relação ao Solo</i>				Total
		A1		A2		
<i>Camuflagem</i>		Sim	Não	Sim	Não	
<i>Predação</i>	Sim	18	11	5	2	36
	Não	7	14	20	23	64
Total		25	25	25	25	100

P x A = Predação x Altura; P x C = Predação x Camuflagem.

$\chi^2_{\text{Total}} = 26,03$; $p = 0,001$; $gl = 4$. P x A: $\chi^2 = 22,04$; $p = 0,001$; $gl = 3$. P x C: $\chi^2 = 5,54$; $p = 0,136$; $gl = 3$

Tabela 4: Teste de independência mútua através de tabela de contingência tridimensional para a predação de pupas implantadas em Águas Belas (ABE), considerando o fenótipo em relação ao nível do solo. Os números representam a quantidade de pupas resultante em cada situação.

		<i>Nível em Relação ao Solo</i>				Total
		A1		A2		
<i>Fenótipo</i>		Claro	Escuro	Claro	Escuro	
<i>Predação</i>	Sim	19	18	5	4	47
	Não	6	7	20	21	53
Total		25	25	25	25	100

P x A = Predação x Altura; P x F = Predação x Fenótipo

$\chi^2_{\text{Total}} = 31,72$; $p = 0,001$; $gl = 4$. P x A: $\chi^2 = 31,61$; $p = 0,001$; $gl = 3$. P x F: $\chi^2 = 0,24$; $p = 0,971$; $gl = 3$.

Tabela 5: Teste de independência mútua através de tabela de contingência tridimensional para a predação de pupas implantadas no IPH, considerando o fenótipo em relação ao nível do solo. Os números representam a quantidade de pupas resultante em cada situação.

		<i>Nível em Relação ao Solo</i>				Total
		A1		A2		
<i>Fenótipo</i>		Claro	Escuro	Claro	Escuro	
<i>Predação</i>	Sim	12	17	3	4	36
	Não	13	8	22	21	64
Total		25	25	25	25	100

P x A = Predação x Altura; P x F = Predação x Fenótipo

$\chi^2_{\text{Total}} = 29,78$; $p = 0,001$; $gl = 4$. P x A: $\chi^2 = 21,58$; $p = 0,001$; $gl = 3$. P x F: $\chi^2 = 2,22$; $p = 0,528$; $gl = 3$

Tabela 6: Lista das espécies de formigas encontradas sobre as pupas implantadas nos dois locais de estudo (ABE e IPH).

<i>Formicidae</i>		
Subfamília		Atividade em relação à pupa
Myrmicinae	<i>CreMATogaster</i> sp.1 (*)	Remoção
Ponerinae	<i>Odontomachus chelifer</i>	Remoção
Ponerinae	<i>Pachycondyla striata</i>	Remoção
Myrmicinae	<i>Solenopsis</i> sp	Não determinado

(*) Conforme a coleção de referência de Formicidae do Laboratório de Insetos Sociais, UNISINOS, São Leopoldo, RS.

Figura 1: Um par de pupas de *Heliconius erato phyllis* em campo (ABE). Pupas próximas ao solo (altura 1), onde a pupa de cor escura foi considerada camuflada enquanto que a pupa de cor clara foi considerada não-camuflada.

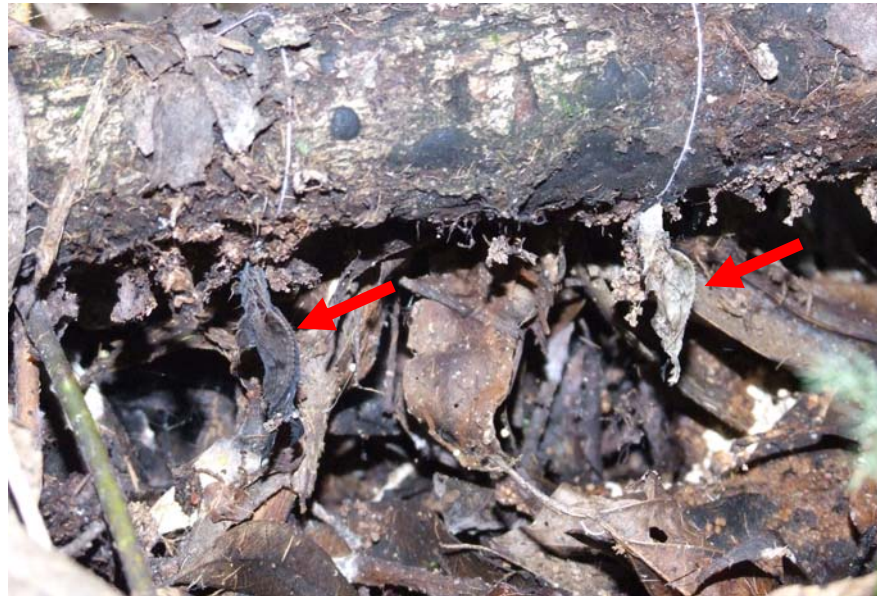
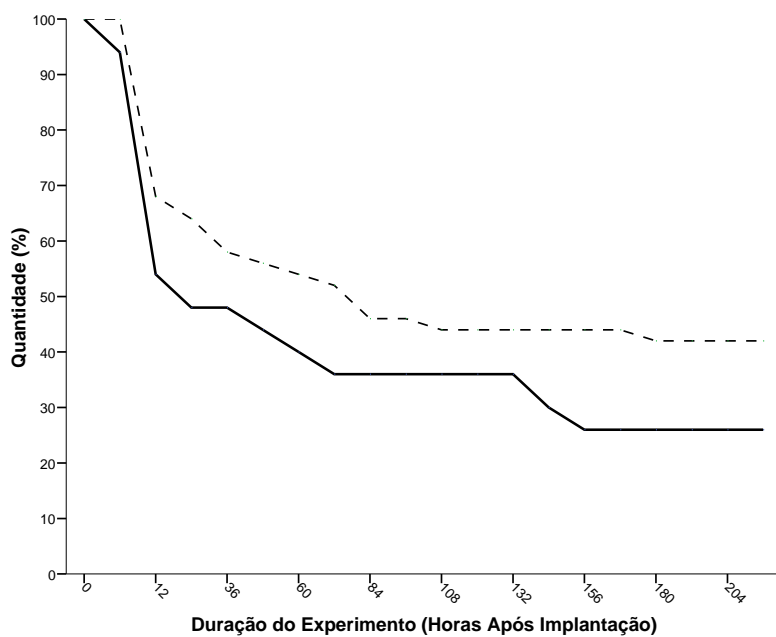


Figura 2: Curvas de sobrevivência para pupas posicionadas próximas ao solo (a) e para pupas implantadas à altura de cerca de 1 metro (b). Linha contínua, ABE; linha tracejada, IPH.

a)



b)

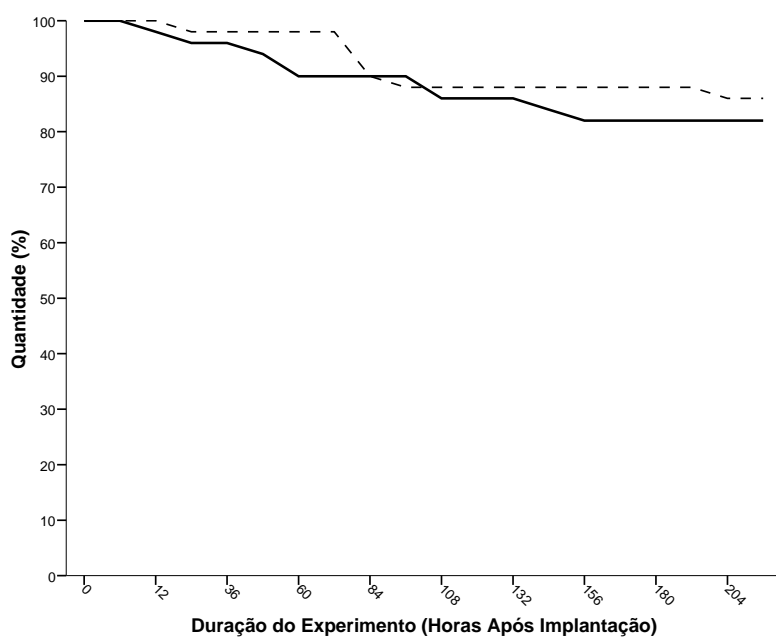


Figura 3: Pupa de *Heliconius erato phyllis* em campo (ABE). Pupas considerada não-críptica implantada na altura 2. Observa-se um buraco na região das asas próximo ao início do abdômen.



Figura 4: Pupa de *Heliconius erato phyllis* em campo (ABE). Pupas considerada não-críptica implantada na altura 2, onde restou apenas o abdômen de uma pupa escura. A seta indica uma formiga (*Solenopsis sp*) que provavelmente chegou após a ação do predador.



Figura 5: Um par de pupas de *Heliconius erato phyllis* em campo (ABE). Pupas próximas ao solo (altura 1). A pupa de cor escura foi considerada camuflada enquanto que a pupa de cor clara foi considerada não-camuflada (ver figura 1). a) notar a presença de um indivíduo de *Pachycondyla striata* (setas) sobre a pupa escura enquanto outro tenta alcançar a pupa clara; b) um indivíduo de *Pachycondyla striata* (seta) está sobre a pupa escura, a qual teve seus apêndices cefálicos arrancados (seta).

a)



b)

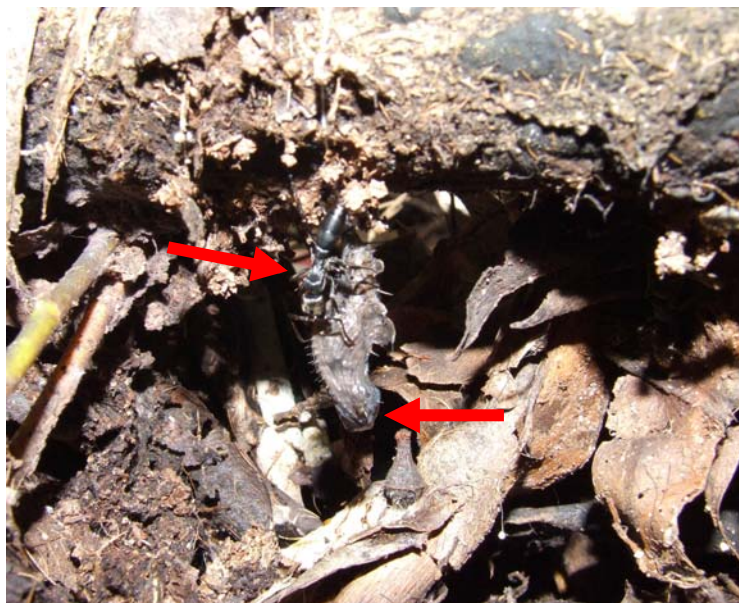


Figura 6: Outra situação em ABE onde uma pupa considerada camuflada, implantada próximo ao solo, está sendo atacada por *Pachycondyla striata*. O par desta pupa estava a 10 cm de distância e não foi importunado, permanecendo no local da implantação até o adulto emergir. a) formiga inspecionando a pupa; b) tentativa de remoção a partir da seda de fixação; c) tentativa de remoção a partir da seda de fixação vista por outro ângulo.

a)



b)



c)



CAPÍTULO 5

Descrição do Primeiro Caso de Metilação de DNA em Uma Borboleta: *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Este manuscrito será submetido ao periódico *Insect Molecular Biology*

Descrição do Primeiro Caso de Metilação de DNA em Uma Borboleta: *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Adriano Andrejew Ferreira¹, Gabriela Pasqualim², Rosane Nunes Garcia³ e Aldo Mellender de Araújo¹

1. Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.
3. Departamento de Ciências Exatas e da Natureza, Colégio de Aplicação, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Palavras-chave: Cor da Pupa, *Heliconius erato*, Inseto, Metilação, PCR Bissulfito.

Resumo

Pupas da borboleta *Heliconius erato phyllis* apresentam um contínuo quanto ao grau de melanização. Estudos prévios mostraram que as estimativas da herdabilidade desta característica, determinadas pelo método da regressão linear, apresentavam valores muito diferentes conforme fossem considerados machos e suas proles ou fêmeas e suas proles. Uma causa possível para esta discrepância poderia ser devido à ocorrência de metilação do DNA e possível silenciamento dos genes responsáveis pelo fenótipo da pupa. No presente trabalho, utilizamos as técnicas de MSRE e PCR bissulfito com *primers* aleatórios, a fim de verificar se estas são eficientes para a detecção de seqüências metiladas no genoma daquela borboleta. A análise, utilizando DNA de diferentes fases do desenvolvimento, mostrou que a técnica de PCR bissulfito foi particularmente eficiente para indicar a presença de metilação no DNA desta espécie. Isto abre, portanto, a possibilidade de investigações futuras direcionadas para avaliar se este fenômeno tem relação com a determinação dos padrões diferenciais de coloração das pupas em *H. erato phyllis*. O fenômeno aqui relatado corresponde ao primeiro caso de metilação no genoma de uma borboleta.

Introdução

O estudo da metilação no DNA tem poucas décadas de existência e inicialmente este processo epigenético foi descrito em mamíferos, apontando para o fato de que os insetos, tais como *Drosophila*, por exemplo, teriam o seu genoma livre de metilação (Urieli-Shoval *et al.*, 1982). Porém, pesquisas mais recentes confirmaram que a metilação do DNA ocorre em representantes de diferentes filos, e que alguns motivos das DNA metiltransferases (DNMT) são evolutivamente conservados, ocorrendo desde bactérias, alguns insetos, plantas e mamíferos (Kumar *et al.*, 1994; Colot & Rossignol, 1999; Hendrich & Tweedie, 2003). O processo de modificação epigenética através da metilação do DNA pode, portanto, estar amplamente conservado entre os seres vivos, mas com funções diferentes das descritas inicialmente para os mamíferos (Field *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2007).

Em insetos, a metilação do DNA já foi descrita por Deobagkar e colaboradores (1982) em *Planococcus citri* (Hemiptera). Além de outros trabalhos, dentro desta mesma ordem (Achwal *et al.*, 1983; Field, 1989; Manicardi *et al.*, 1994), a ocorrência da metilação do DNA também já foi descrita em Orthoptera (Sarkar *et al.*, 1992), Diptera (Nayak *et al.*, 1991; Gowher *et al.*, 2000; Lyko *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2007), Lepidoptera (Patel & Gopinathan, 1987; Mandrioli, 2002) e Hymenoptera (Wang *et al.*, 2006). As funções da metilação em insetos estão relacionadas, por exemplo, com a regulação gênica, como no afídio *Myzus persicae* e com o *imprinting* genômico em *Planococcus citri* (Field *et al.*, 2004).

Analisando a coloração da pupa na borboleta *Heliconius erato phyllis*, (Nymphalidae) Ferreira *et al.* (2006) encontraram que esta característica possui um

controle genético poligênico, com forte influência ambiental. A coloração clara ou escura das pupas é determinada pela atuação conjunta de fatores genéticos e ambientais. No entanto, a herdabilidade para esta característica, estimada pelo método da regressão linear, diferiu quando eram levados em conta os escores paternos em relação às médias das proles (valores positivos) daqueles quando se considerou os escores maternos em relação às médias das proles (valores negativos). Fatores epigenéticos que poderiam estar atuando no genoma de *H. erato phyllis*, parecem ser uma explicação atrativa para o fenômeno observado por Ferreira *et al.* (2006).

A fim de se iniciar um processo de investigação neste sentido, utilizou-se, então, as técnicas de MSRE (*Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease*) e PCR bissulfito com *primers* aleatórios, com o objetivo de verificar se estas técnicas seriam eficientes para a detecção de seqüências metiladas no genoma de *H. erato phyllis*. Os resultados demonstraram que a técnica de PCR bissulfito foi particularmente eficiente, mas, com os dados obtidos aqui, não se pode ainda determinar o quanto a metilação é responsável pela herança diferencial no padrão de coloração das pupas. Entretanto, abre-se uma importante perspectiva para investigações futuras do papel deste fenômeno epigenético no genoma desta espécie.

Resultados

A figura 1 mostra os padrões gerados pelas quatro enzimas de restrição testadas (*HpaII*, *HhaI*, *MboI* e *MspI*) em uma pupa macho de *H. erato phyllis*. A análise dos padrões de restrição de *HpaII* e *MspI* mostra que estas duas enzimas deixam vários fragmentos de alto peso molecular não digeridos. Estas duas enzimas são isoesquizômeros

que reconhecem a mesma seqüência 5'CCGG3', mas enquanto *HpaII* cliva seu sítio independente do fato da citosina externa (C 5') estar metilada, *MspI* não cliva esta seqüência nesta situação. Inversamente, *MspI* cliva seu sítio independente do fato da citosina interna estar metilada (C 3') enquanto *HpaII* não cliva a seqüência nesta condição. Os padrões de clivagem das enzimas *HhaI* (5'GCG↓C3', onde a citosina em negrito é sensível a metilação) e *MboI* (5'↓GATC3', não sensível à metilação) mostram um padrão de clivagem de baixo peso molecular. Resultados similares foram encontrados para larva, pupa fêmea e adultos de ambos os sexos (dados não mostrados).

Em decorrência dos resultados acima, uma alíquota do DNA genômico de diferentes fases do desenvolvimento de *H. erato phyllis* foi tratada com bissulfito de sódio e submetida à amplificação para confirmar, ou não, a presença de metilação no genoma desta espécie.

Entre sete *primers* aleatórios testados neste trabalho, apenas os *primers* de número 4 e 5 foram eficientes na amplificação, tanto no DNA tratado com bissulfito de sódio como no DNA controle (Figura 2 e 3). Os demais *primers* não produziram amplificação no genoma de *H. erato phyllis*.

O DNA tratado com bissulfito de sódio exibe em comum com o DNA controle, bandas mais intensas em fragmentos de $\cong 500$ pb; estas bandas são comuns também para todos os estágios de desenvolvimento e para ambos os sexos. Nesta mesma situação ocorrem bandas em torno de 850 pb. No DNA controle, principalmente no padrão da pupa macho, ocorre bandas mais intensas com tamanho de 1650 pb. No resultado da amplificação do DNA tratado com bissulfito é importante destacar a presença de bandas ($\cong 1000$ pb) que são comuns para ambos os sexos no estágio adulto, mas que não estão presentes nos outros estágios de desenvolvimento (Figura 2).

Para testar a eficiência da conversão com bissulfito de sódio as mesmas amostras de DNA foram submetidas à PCR com *primers* do gene de β -actina. Exclusivamente nas amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio não houve amplificação do gene, indicando a eficiência da conversão das citosinas não metiladas (Figura 4).

Discussão

O papel central da metilação do DNA na manutenção de funções celulares e o reconhecimento de que as mudanças nos padrões de metilação podem ter ampla implicação na saúde humana criaram uma grande necessidade por técnicas confiáveis para detectar e quantificar a metilação no DNA (Dahl & Guldborg, 2003). Esta busca por novas técnicas, acabou também, por favorecer o desenvolvimento para detecção e quantificação da metilação em outros organismos, inclusive em insetos. O seqüenciamento bissulfito, o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e a imunohistoquímica revelaram que em *D. melanogaster*, por exemplo, as citosinas metiladas estão preferencialmente relacionadas a dinucleotídeos CpT e CpA, ao contrário do que acontece nos demais organismos estudados, onde a preferência é pela metilação dos dinucleotídeos CpG. Também se sabe que apenas 0,4% do DNA total de *D. melanogaster* é metilado, sendo que estes níveis são detectados apenas em embriões no estágio inicial de desenvolvimento (Hung *et al.*, 1999; Tweedie *et al.*, 1999; Lyko *et al.*, 2000; Lyko, 2001; Kunert *et al.*, 2003).

O tratamento com bissulfito converte as citosinas que não estão metiladas em uracila. A presença de amplificação no DNA tratado com bissulfito de sódio mostra que os sítios de anelamento do *primer* em algumas regiões do DNA genômico foram preservados (Figura 2 e 3). As diferenças que ocorrem entre o DNA controle e o DNA tratado com

bissulfito (ausência de algumas bandas, Figura2) podem ser explicadas pelo fato de que as regiões onde as citosinas não estavam protegidas pela metilação foram modificadas, o que impediu o anelamento do *primer*. Os resultados fornecidos pelos *primers* da β actina corroboram a eficiência da técnica com o bissulfito de sódio, tendo em vista que as amostras tratadas não amplificaram (Figura 4).

Os resultados obtidos em *H. erato phyllis* utilizando a técnica de MSRE, indicam que pode estar ocorrendo metilação das duas citosinas em sítios CCGG, tendo em vista que os padrões de clivagem em *MspI* e *HpaII* ficaram semelhantes, com a presença de vários fragmentos não digeridos de alto peso molecular para ambas as enzimas. Esta hipótese poderia ser sustentada pelo fato de que a enzima *HhaI*, que também é sensível à metilação e reconhece sítios GCGC, tem um padrão de clivagem similar a *MboI*, com um padrão de clivagem de baixo peso molecular, o que indica digestão intensa no DNA.

Por outro lado, se o genoma de *H. erato phyllis* for pobre em seqüências de reconhecimento das enzimas *MspI* e *HpaII*, o padrão de digestão com alto peso molecular pode ser decorrente deste fenômeno e não da presença de citosinas metiladas. Porém, o resultado obtido pela técnica de PCR bissulfito e apoiado pelos resultados obtidos por Mandrioli & Volpi (2003), os quais apontam para um conteúdo de citosinas metiladas na mariposa *Mamestra brassicae* em torno de 9% e que os sítios de ocorrência são 5' CCGG 3', corroboram a primeira hipótese fornecida pela análise dos resultados da técnica MSRE.

Os resultados das duas técnicas (MSRE e PCR bissulfito) analisados em conjunto, portanto, indicam a presença de citosinas metiladas em *H. erato phyllis*, apontando para mais uma espécie da ordem Lepidoptera, com metilação em seu DNA. Um aspecto importante a ser destacado é que se trata do primeiro caso descrito para borboletas (subordem Rhopalocera). Outro destaque refere-se ao fato de se tratar de um gênero

amplamente estudado quanto a outros aspectos de biologia evolutiva (seleção natural e mimetismo, filogenias). As duas espécies de lepidóptera anteriormente descritas como possuindo DNA metilado, *Bombyx mori* (Patel & Gopinathan, 1987) e *Mamestra brassicae* (Mandrioli, 2002), pertencem à subordem Heterocera (mariposas). As duas técnicas utilizadas para a detecção em *H. erato phyllis*, MSRE e o método de PCR bissulfito, são confiáveis e amplamente utilizadas na detecção da metilação no DNA (Dahl & Guldborg, 2003).

Os resultados apresentados não permitem maiores conclusões em relação à função da metilação em *H. erato phyllis*, visto que as metodologias empregadas restringiram-se à detecção do fenômeno, como foi o objetivo proposto inicialmente. Inferências sobre a função da metilação nesta espécie, como efeitos epigenéticos atuando sobre a herança da cor da pupa (Ferreira *et al.*, 2006), não podem efetivamente ser propostas neste momento, ainda que seja possível observar pela técnica de PCR bissulfito o aparecimento de bandas que diferem entre o estágio adulto, quando comparado aos estágios imaturos (Figura 2). A metilação em insetos, diferentemente de alguns casos já documentados para mamíferos, pode apresentar funções diversas entre as espécies (ver revisão de Field *et al.*, 2004).

Mandrioli & Borsatti (2006) reúnem dados indicando que a metilação em insetos e outros invertebrados ocorre dentro de regiões codificantes de alguns genes, diferentemente do que ocorre com mamíferos onde a região promotora do gene é que está metilada. Um exemplo recente disto é o que ocorre em *Apis mellifera*. A metilação neste inseto está predominantemente limitada a regiões codificantes de genes (Wang *et al.*, 2006). Os dados obtidos para *A. mellifera* corroboram trabalhos anteriores como o de Salzberg *et al.* (2004), por exemplo, que já haviam identificado porções codificantes de genes metilados em

Drosophila. Estes dados indicariam que a metilação em insetos está atuando na regulação e não no silenciamento de genes (Mandrioli & Borsatti, 2006).

Finalmente, o presente trabalho demonstrou dois pontos importantes. O primeiro deles seria de que a descoberta da existência de metilação no DNA genômico de *H. erato phyllis* pode ser importante para a compreensão de como esses processos epigenéticos estariam ou não conservados em espécies relacionadas e qual a importância disto para evolução destes grupos de organismos. O segundo ponto é que a técnica de PCR bissulfito, amplamente empregada em mamíferos (Jones & Takai, 2001; Kang *et al.*, 2001; Laird *et al.*, 2004, como exemplo), é eficiente para ser utilizada em Lepidoptera.

Procedimentos Experimentais

Animais utilizados

O material biológico utilizado neste trabalho provém de borboletas criadas em insetário. Os ovos foram coletados diariamente e acondicionados em potes plásticos translúcidos com tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro), sendo o fundo coberto com papel absorvente branco; a uma temperatura de 25°C com luz constante. No estágio larval as lagartas foram alimentadas com *Passiflora suberosa* e os imagos foram alimentados com uma mistura de mel, água e pólen.

Os adultos utilizados foram acondicionados individualmente em envelopes entomológicos, onde foram anotadas as informações gerais sobre a borboleta e colocados em freezer a -20°C. As pupas, larvas e ovos foram congelados em tubos para microcentrífuga. As lagartas utilizadas foram anestesiadas com gelo, no 5º ínstar de desenvolvimento (último ínstar antes do estágio de pupa), e dissecadas para remoção do

trato digestivo, sendo imediatamente congeladas. Os ovos tiveram seu desenvolvimento interrompido com 72hs à -20°C. Com a intenção de diminuir a presença de bandas oriundas de polimorfismos que poderiam ser detectados com os *primers* aleatórios, um casal de irmãos de *Heliconius erato phyllis*, virgens, foi isolado em um insetário para cópula, garantindo que os ovos coletados da fêmea fossem de um único macho.

Isolamento de DNA genômico

Para o processo de extração de DNA foram testados diferentes protocolos. Os melhores resultados foram obtidos com os protocolos de Lodhi *et al.* (1994) e Lefort & Douglas (1999). Ambos foram descritos e compilados para extração de DNA de vegetais e posteriormente testados, com sucesso, na extração de DNA da borboleta *Dryas julia* (Mega & Revers, não publicado).

A extração do DNA genômico para ser utilizado na técnica MSRE (*Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease*) foi feita de uma larva, uma pupa macho e uma pupa fêmea, um adulto macho e um adulto fêmea não endocruzados. A extração de DNA para o tratamento com bissulfito de sódio foi feita de 28 ovos com 72 horas de desenvolvimento, uma larva, uma pupa macho e uma pupa fêmea, um adulto macho e um adulto fêmea, todos pertencentes à mesma prole endocruzada. A extração de DNA genômico dos adultos utilizou somente a cabeça e o tórax dos indivíduos. Para os outros estágios de desenvolvimento utilizou-se a estrutura completa, que foram preparadas como previamente descrito.

Análises com a técnica MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease)

Clivou-se de 3 a 4 µg do DNA genômico de uma larva de 5º instar, assim como de uma pupa macho e uma fêmea, e um adulto macho e um adulto fêmea (indivíduos não aparentados) com as enzimas de restrição *HpaII*, *HhaI*, *MboI* – Invitrogen – e *MspI* – Promega, fracionados em gel de agarose 1%, e corado com brometo de etídio. *HpaII* não cliva o DNA quando 5' C↓CGG3' C 3' está metilado na seqüência; similarmente, *HhaI* não cliva quando 5' GCG↓C3' C 5' está metilado na seqüência e *MspI* quando 5' C↓CGG3' C 5' está metilado na seqüência. *MboI* que cliva a seqüência 5' ↓GATC3' é insensível a metilação. DNA ladder (1kb) – Promega foi utilizado como marcador de peso molecular para este experimento.

PCR Bissulfito

Duas µg de DNA de cada estágio de desenvolvimento foram tratadas com bissulfito de sódio (NaHSO₃) conforme o protocolo adaptado de Hayatsu *et al.* 1970; Tremblay 1998; Clark *et al.* 1994; Frommer *et al.* 1992; Oakeley 1999; Fraga & Esteller, 2002; Li & Dahiya, 2002, disponível na URL <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Bisulfite-Modification--Conversion--of-DNA-3160.html>.

Sete *primers* aleatórios foram testados na amplificação da alíquota de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio. As seqüências dos *primers* aleatórios testados estão na Tabela 1. As condições de reação para uma alíquota de 4µl de DNA e 0,12µl de Taq DNA polimerase foram 3 min a 95°C; 40s a 95°C, 2 min a 40°C e 2 min a 72°C para um total de 39 ciclos; 5 min a 72°C. Os mesmos sete *primers*, também foram utilizados na amplificação de 2 µg de DNA genômico não tratado, utilizado como controle.

O controle utilizado para verificar a eficiência da conversão pelo bissulfito de sódio foi feito com a utilização do *primer* da β actina, pois a seqüência do gene que codifica esta

proteína está descrita como não metilada em diferentes organismos tais como *Psammochinus miliaris* e *Branchiostoma lanceolatum* (Tweedie *et al.*, 1997). As seqüências dos *primers* da β actina estão na Tabela 1. As condições de reação para uma alíquota de 1 μ l de DNA e 0,12 μ l de Taq DNA polimerase foram 5 min a 94°C; 40s a 94°C, 30s a 58°C e 40s a 72°C para um total de 39 ciclos; 7 min a 72°C; 5 min a 10°C. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Referências Bibliográficas:

- Achwal, C.W., Chiara, A.I. and Chandra, H.S. (1983) Immunochemical evidence for the presence of 5mC, 6mA and 7mG in human, *Drosophila* e mealybug DNA. *FEBS Lett.* 158: 353-358.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. and Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22: 2990–2997.
- Colot, V. and Rossignol, J.L. (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21: 402-411.
- Dahl, C. and Guldberg, P. (2003) DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology* 4: 233-250.
- Deobagkar, D.N., Muralidharam, K., Devare, S.G., Kalghatgi, K.K., and Chandra, H.S. (1982) DNA methylation. *J Biosci* 4: 513-526.
- Ferreira, A.F., Garcia, R.N. and Araújo, A.M. (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.
- Field, L.M. (1989) Changes of DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *FEBS Lett.* 243: 323-327.
- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioloi, M. and Prantera, G. (2004) DNA methylation in insects. *Insect Mol. Biol.* 13 (2); 109-115.
- Fraga, M.F. and Esteller, M. (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33: 632-649.

- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L. (1992) A Genomic Sequencing Protocol that Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1827-1831.
- Garcia, R.N., D'Ávila, M.F., Robe, L.J., Loreto, E.L.S., Panzera, Y., Heredia, F.O. and Valente, V.L.S. (2007) First evidence of methylation in the genome of *Drosophila willistoni*. *Genetica* 131: 91-105.
- Gowher, H., Leismann, O. and Jeltsch, A. (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J.* 19: 6918-6923.
- Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. and Iida, S. (1970) Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine and their derivatives. *Biochemistry* 9: 2858-2865.
- Hendrich, B. and Tweedie, S. (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19 (5): 269-277.
- Hung, M.S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H.C., Kingler, J. and Shen, J. (1999) *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(21): 11940-11945.
- Jones, P.A. and Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070.
- Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K. and Han, Y.M. (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 28: 173-177.
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Sha, M., Posfai, J., Roberts, R.J. and Wilson, G.G. (1994) The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 22:1-10.
- Kunert, N., Marhold, J., Stach, D. and Lyko, F. (2003) A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.
- Laird, C.D., Pleasant, N.D., Clark, A.D., Sneed, J.L., Hassan, K.M.A., Manley, N.C., Vary Jr., J.C., Morgan, T., Hansen, R.S. and Stöger, R. (2004) Hairpin-bisulfite PCR: Assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:204-209.
- Lefort, F. and Douglas, G.C. (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann Forest Sci* 56: 259-263.

- Li, L.C. and Dahiya, R. (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18(11):1427-31.
- Lyko, F. (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.* 17(4): 169-172.
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H. and Jaenisch, R. (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408: 538-540.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol Biol Rep* 12(1): 6-13.
- Mandrioli, M. (2002) Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosomes of the lepidopteran *Mamestra brassicae*. *Chromosome Res* 11: 51-56.
- Mandrioli, M. and Volpi, N. (2003) The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica* 119: 187-191.
- Mandrioli, M. and Borsatti, F. (2006) DNA methylation of fly genes and transposons. *Cell Mol Life Sci* 63: 1933-1936.
- Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Azzoni, P. and Bianchi, U. (1994) Cytological and electrophoretic analysis of DNA methylation in the holocentric chromosomes of *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae). *Genome* 37: 625-630.
- Nayak, A.R., Nair, J.S., Hadge, M.V., Ranjekar, P.K. and Pant, U. (1991) Genome analysis of two mosquito species. *Insect Biochem.* 21: 803-808.
- Oakeley, E.J. (1999) DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Ther* 84: 389-400.
- Patel, C.V. and Gopinatham, K.P. (1987) Determination of trace amounts of 5-methylcytosine in DNA by HPLC. *Anal. Biochem.* 164: 164-169.
- Salzberg, A., Fisher, O., Siman-Tov, R. and Ankri, S. (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322(2): 465-469.
- Sarkar, S., Rao, S.R.V., Gupta, V.S. and Hendre, R. (1992) 5-methylcytosine content in *Gryllotalpa fossor* (Orthoptera). *Genome* 35: 163-166.
- Tremblay, K.D. (1998). Bisulfite methylation analysis of single DNA strands. *Trends Genet, Technical Tips Online.* 01242.
- Tweedie, S., Charlton J., Clark, V. and Bird, A. (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1469-1475.

- Tweedie, S., Ng, H.H., Barlow, A.L., Turner, B.M., Hendrich, B. and Bird, A. (1999) Vestigies of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat. Genet.* 23: 389-390.
- Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J. and Razin, A. (1982) The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 6 (146) (1): 148-152.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A. and Robinson, G.E. (2006) Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314: 645-647.

Tabela 1: Sequência dos sete *primers* aleatórios e *primers* da β actina testados na amplificação do DNA genômico de *Heliconius erato phyllis* tratado, ou não, com Bissulfito de Sódio.

<i>Primer</i>	Sequência
H-AP1	5' AAG CTT GAT TGC C 3'
H-AP2	5' AGG CTT CGA CTG T 3'
H-AP3	5' AAG CTT TGG TCA G 3'
H-AP4	5' AAG CTT CTC AAC G 3'
H-AP5	5' AAG CTT AGT AGG C 3'
H-AP6	5' AAG CTT GCA CCA T 3'
H-AP7	5' AAG CTT AAC GAG G 3'
β actina senso	5' AAT CAC CAT CGG CAA CGA G 3'
β actina reverso	5' GAA GCA CTT GCG GTG GAC GAT 3'

Figura 1: Padrão de fragmentos obtidos após a digestão total do DNA genômico de uma pupa macho de *H. erato phylis* com *HpaII* (CCGG), *HhaI* (GCGC), *MspI* (CCGG) e *MboI* (GATC). O tamanho dos fragmentos está indicado no lado esquerdo da figura em pares de kilobase (kb).

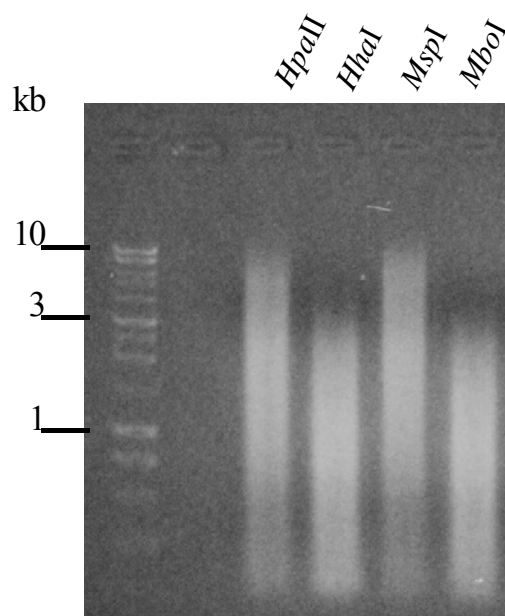
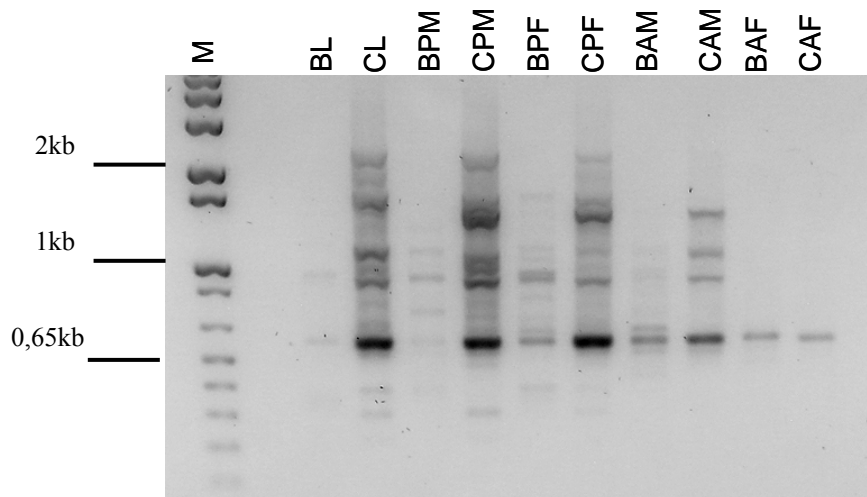


Figura 2: Resultado da detecção de seqüências metiladas no genoma de *Heliconius erato phyllis*, através de PCR bissulfito, com a utilização do *primer* aleatório H-AP5. a) resultado para tratamento bissulfito e controle. b) resultado com a amplificação do tratamento bissulfito (controle não amplificou). É importante notar nesta foto o padrão diferencial de bandas entre o estágio adulto e os estágios imaturos. Amostras correspondentes ao DNA controle não tratado estão antecidas da letra “C” e as correspondentes ao DNA tratado com bissulfito de sódio, antecidas de “B”. M - Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen); L - larva; PM - pupa macho; PF - pupa fêmea; AM - adulto macho; AF - adulto fêmea.

a)



b)

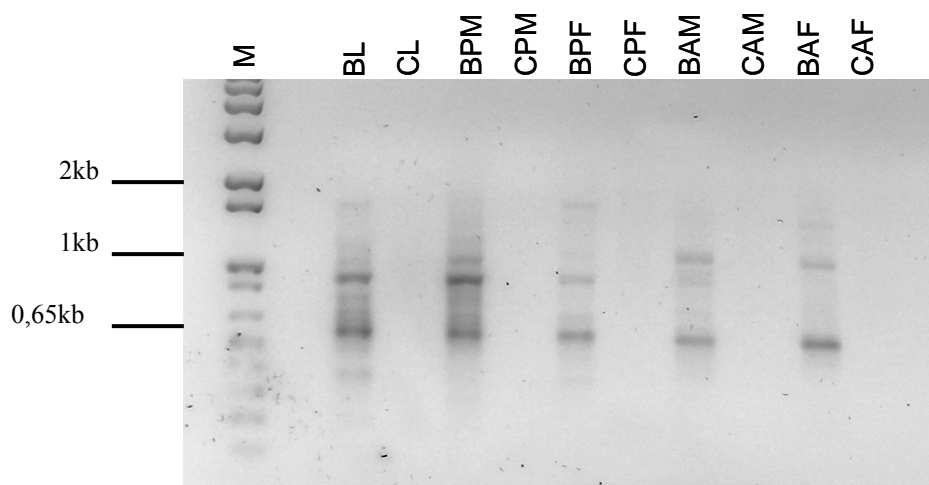


Figura 3: Resultado da detecção de seqüências metiladas no genoma de *Heliconius erato phyllis*, através de PCR bissulfito, com a utilização do *primer* aleatório H-AP4. Estes resultados referem-se apenas ao tratamento bissulfito. O – Ovo; L - larva; PM - pupa macho; PF - pupa fêmea; AM - adulto macho; AF - adulto fêmea; CN – controle negativo.

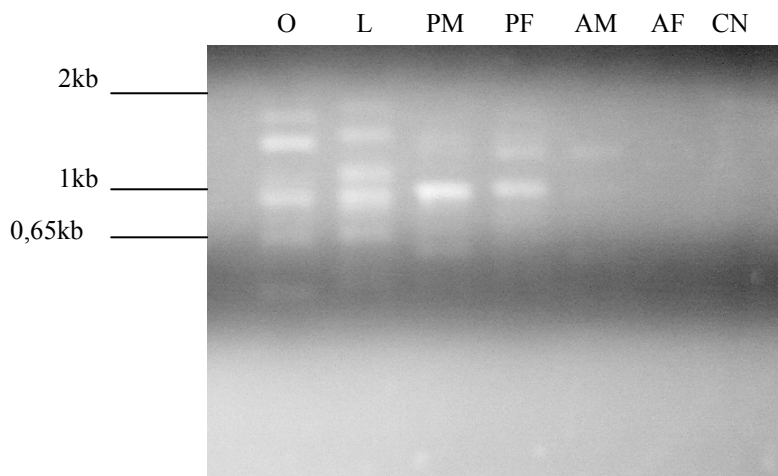
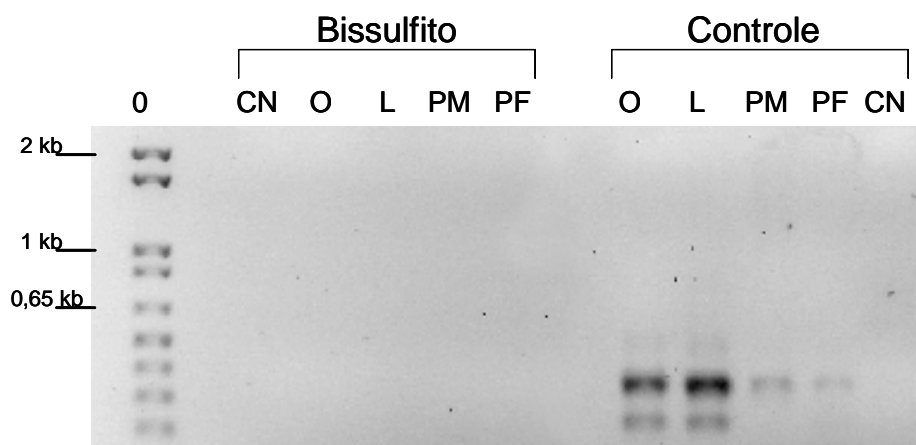


Figura 4: Resultado do PCR bissulfito realizado com *primer* para β -actina em DNA tratado e não tratado com bissulfito de sódio (indicado na figura). 0 - Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen); O - ovo; L - larva; PM - pupa macho; PF - pupa fêmea; CN – controle negativo.



CAPÍTULO 6

Discussão Geral

A modulação fenotípica para a cor da pupa em *Heliconius erato phyllis* proposta por Ferreira *et al.* (2006) abriu questões que foram abordadas nos artigos inclusos nesta tese. O desenvolvimento de uma técnica que avaliasse quantitativamente a coloração das pupas, apresentada no artigo “On the reliability of a simple method for scoring phenotypes to estimate heritability: a case study with pupal colour in *Heliconius erato phyllis*, Fabricius 1775 (Lepidoptera; Nymphalidae)”, não proporcionou os resultados esperados no que se refere a um método prático e direto, como os utilizados por Maisch & Bückmann (1987). Estes autores categorizam as pupas de *Inachis io*, baseando-se na quantidade de manchas escuras que a pupa apresenta, traçando um limite entre cada uma das cinco categorias propostas. É importante ressaltar que o padrão de melanização entre as duas espécies difere, e isto torna impossível a aplicação do método utilizado em *I. io* para *H. erato phyllis*. A substituição do método qualitativo pelo método que aplica a densidade óptica, seria oportuna caso o último apresentasse uma melhora na estimativa da herdabilidade devido a uma melhor discriminação do fenótipo.

As estimativas da herdabilidade calculadas para este artigo não diferem daquelas calculadas por Ferreira *et al.* (2006). Desta forma, a falta de significância observada, talvez seja apenas superada quando utilizarmos um grande número de pares (genitores:proles) no cálculo da estimativa pelo método da regressão linear, como proposto por Falconer (1989).

Uma hipótese alternativa proposta, e que necessita ser testada, é aquela da prioridade na alocação de recursos (allocation-priority) proposta por Glazier (2002). Esta hipótese propõe que fenótipos com baixa prioridade no sistema de alocação de recursos estariam sujeitos a maior influência ambiental e por consequência teriam uma menor herdabilidade. Esta hipótese será testada por nosso laboratório envolvendo diversas situações de estresse em *H. erato phyllis* com posterior estimativa da herdabilidade para vários fenótipos.

A duração de horas de luz em um dia é um fator ambiental que não mostrou efeito sobre a cor da pupa em *H. erato phyllis*. Este fato é compartilhado por *Battus philenor* e *Eurytides marcellus*; espécies que entram em diapausa no início do inverno e permanecem no estágio de pupa até as condições climáticas voltarem a ser favoráveis (Hazel & West, 1979; Hazel & West, 1983). O efeito do fotoperíodo, como indicativo de mudança climática brusca, talvez não faça sentido para *H. erato phyllis*, uma subespécie que habita principalmente regiões tropicais, onde a menor quantidade de horas de luz em um dia não está associado com a queda brusca na temperatura, como ocorre no hemisfério Norte. Uma hipótese especulativa, para populações de *H. erato phyllis* que habitam regiões de clima temperado, seria a formação de pupas escuras para auxiliar na termorregulação, como o que ocorre com *Lycaena phlaeas daimio* (Usui *et al.*, 2004), *Papilio polyxenes* e *P. troilus* (Hazel & West, 1983). Porém, o fato observado para *H. erato phyllis* nas regiões temperadas é a extinção de populações locais como mostrado por Saalfeld & Araújo (1981), ocorrendo posterior recolonização a partir de regiões mais quentes (Ribeiro *et al.*, não publicado). Assim, uma possível seleção para pupas escuras, influenciadas pelo fotoperíodo de inverno, que em geral, está associada com espécies oriundas do hemisfério Norte, como por exemplo *P. polytes* e *P. demoleus* (Smith, 1978), necessitaria de um isolamento populacional, onde indivíduos que fossem provenientes de pupas escuras, as

quais poderiam ter sido estimuladas pela mudança de fotoperíodo, obtivessem vantagem sobre indivíduos não sensíveis a esta situação. Este episódio hipotético forneceria “material” para a seleção natural atuar e levaria ao conseqüente aumento na frequência destes indivíduos. Porém, para esta hipótese merecer crédito, além da necessidade de pesquisar a frequência dos fenótipos das pupas em campo, esta teria de ser maior para pupas escuras.

A modulação fenotípica é um termo utilizado por Smith-Gill (1983) para designar a plasticidade de um fenótipo com variação contínua. Assim, a cor da pupa em *H. erato phyllis*, um caso de modulação fenotípica, pode ser ou não adaptativa, como todo fenótipo plástico (West-Eberhard, 2003). Os testes em campo com as pupas de *H. erato phyllis* permitem especular sobre a função adaptativa deste fenótipo. Os dados referentes a pupas implantadas até 30 cm de distância do solo indicam fortemente que estas pupas não são protegidas pelo seu fenótipo plástico, visto que os principais predadores são formigas. Esta constatação está de acordo com a proposição de Wiklund (1975) onde a vantagem seletiva para o polimorfismo na coloração da pupa estaria relacionada com a composição de predadores, bem como com a densidade populacional destes. Ou seja, a camuflagem pela coloração não se efetiva em *H. erato phyllis*, pelo menos em pupas próximas ao solo, pelo fato da predação não ser visual.

É possível que tal situação seja diferente para pupas implantadas acima de 1m de altura. Considerando-se apenas pupas predadas, que não apresentavam vestígios de que foram atacadas por formigas, as pupas conspícuas tiveram uma maior incidência de predação (3 / 5) do que as camufladas (2 / 5), porém esta diferença não foi significativa. Um aumento no número amostral seria indicado para a obtenção de respostas mais confiáveis. Hazel *et al.* (1998) avaliando a sobrevivência de *Papilio polyxenes*, aponta para

uma maior sobrevivência de pupas implantadas afastadas do solo e que camuflam-se com fundo verde. Concluem, estes autores, que a seleção poderia estar atuando sobre a preferência de empupar em locais afastados do solo e para pupas influenciáveis pelo ambiente. É plausível que tal situação não seja um caso isolado, ocorrendo apenas em *P. polyxenes*. *H. erato phyllis*, bem como outras espécies, também poderiam estar se beneficiando desta interação entre os dois mecanismos de proteção. Porém, são necessários experimentos que validem esta hipótese.

Pachycondyla striata, fotografada durante a remoção de algumas pupas, é uma espécie que, presumo baseado nas observações, avalia a sua presa quando não obtém sucesso na remoção. Esta avaliação lhe permite identificar pontos frágeis que podem facilitar a remoção quando se investe contra eles. O mesmo procedimento foi observado para *Odontomachus chelifer*. O gênero *Crematogaster*, devido ao seu tamanho em relação a presa, se utiliza da estratégia de remover pequenos pedaços das pupas, um trabalho lento e contínuo, mas com êxito. A situação de formigas como predadoras de pupas, ainda não foi descrita na literatura. Porém, isto não implica que o fato não ocorra, ou tenha ocorrido em experimentos desenvolvidos por outros pesquisadores. A ausência completa da pupa é comum e frequentemente atribuída a pássaros ou mamíferos (West & Hazel, 1982; White, 1986). O fato da predação por formigas não ter sido detectada ainda, talvez resida na maneira como os experimentos são delineados; em geral as inspeções não são diárias, o que diminui a chance de observação de formigas agindo sobre as pupas. Desta forma, seria importante que este trabalho estimulasse novas pesquisas sobre o tema, inclusive no hemisfério Norte, onde pupas em diapausa estão expostas a riscos por um longo período.

A descrição do primeiro caso de metilação em uma borboleta torna-se mais significativa por tratar-se de um organismo que pode ser considerado como modelo para

estudo; se não entre os insetos, posto ocupado por *Drosophila melanogaster*, certamente entre as borboletas. Isto devido às facilidades com que este organismo é mantido em laboratórios e insetários. A constatação de metilação em *H. erato phyllis* abre portas no que se refere à função deste evento. A análise das figuras 2 e 3 (capítulo 5) permite especular que a metilação presente nos estágios imaturos é semelhante e que difere em algumas seqüências para o estágio adulto. Estaria esta modificação no padrão de metilação entre imaturos e adultos associada à coloração da pupa? Os resultados mostrados não permitem concluir sobre isto, mas estimulam a busca por resultados que indiquem o motivo deste padrão desigual. O trabalho de Wang *et al.* (2006) mostra a presença de metilação em regiões codificadoras de *Apis mellifera*. Tal situação aponta para uma função regulatória por parte da metilação.

Outra situação que deve ser destacada é a completa associação entre os resultados observados para machos e fêmeas. A falta de um padrão de metilação sexo-específica, como a detectada por Garcia *et al.* (2007) em *Drosophila willistoni*, não corrobora com a hipótese da metilação estar ligada a um possível caso de *imprinting* genômico; que acabaria por silenciar genes responsáveis pela coloração da pupa na fêmea. Isto explicaria a estimativa da herdabilidade desigual encontrada para machos e fêmeas em relação a sua prole (Ferreira *et al.*, 2006). Contudo, não existem, ainda, informações suficientes, tanto para confirmar como para refutar a hipótese de silenciamento de genes para a coloração da pupa. Desta forma a única informação concreta é presença de metilação no genoma de *H. erato phyllis*.

Este projeto de doutorado envolvendo aspectos da modulação fenotípica na cor da pupa em *H. erato phyllis* teve desdobramentos envolvendo anomalias surgidas em nossas criações de imaturos e adultos. O surgimento de um fenótipo atípico em adultos desta

espécie, falta de pigmentos vermelho e amarelo, estimulou a busca por uma explicação, a partir da análise dos indivíduos anômalos e através da literatura. Outra anomalia refere-se ao possível efeito viral, pelo VPN, na coloração das pupas, o qual estaria “estimulando” a produção de pupas escuras. Estes dois desdobramentos estão nos anexos 3 e 2, respectivamente. O anexo 1 mostra resultados preliminares de um processo de seleção para fenótipos extremos na cor da pupa de *H. erato phyllis*.

Referências Bibliográficas

- Angersbach, D. and H. Kayser. 1971. Wavelength dependence of light controlled pupal pigmentation. *Naturwissenschaften* 11: 571-572.
- Baker RR (1970) Bird predation as a selective pressure on the immature stages of the cabbage butterflies, *Pieris rapae* and *P. brassicae*. *Journal of Zoology*, London 152: 43-59.
- Falconer, D.S., 1989. *Introduction to Quantitative Genetics*, 3rd edition. Longman Scientific & Technical, Essex.
- Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.
- Garcia RN, D'Ávila MF, Robe LJ, Loreto ELS, Panzera Y, Heredia, FO & Valente VLS (2007) First evidence of methylation in the genome of *Drosophila willistoni*. *Genetica* 131: 91-105.
- Glazier, D.S., 2002. Resource-allocation rules and the heritability of traits. *Evolution* 56 (8): 1696-1700.
- Hazel, W. N. 1995. The causes and evolution of phenotypic plasticity in pupal color in swallowtail butterflies. *Swallowtail Butterflies: their Ecology and Evolutionary Biology* (ed. by J. M. Scriber, Y. Tsubaki and R. C. Lederhouse), pp. 205-210. Scientific Publishers, Gainesville, Florida.
- Hazel WN & West DA (1979) Environmental control of pupal colour in swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Battus philenor* (L.) and *Papilio polyxenes* Fabr. *Ecological Entomology* 4: 393-400.
- Hazel WN & West DA (1983) The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. *Ecological Entomology* 8: 37-42.

- Hazel WN, Brandt R & Grantham T (1987) Genetic variability and phenotypic plasticity in pupal colour and its adaptive significance in the swallowtail butterfly *Papilio polyxenes*. *Heredity* 59: 449-455.
- Hazel W, Ante S & Stringfellow B (1998) The evolution of environmental-cued pupal colour in swallowtail butterflies: natural selection for pupation site and pupal colour. *Ecological Entomology*. 23: 41 – 44.
- Maisch A and Bückmann D (1987) The control of cuticular melanin and lutein incorporation in the morphological colour adaptation of a nymphalid pupa, *Inachis io* L. *Journal of Insect Physiology* 33: 393-402.
- Sims SR & Shapiro AM (1983) Pupal colour dimorphism in california *Battus philenor* (L.) (Papilionidae): mortality factors and selective advantage. *Journal of The Lepidopterists' Society* 37: 236-243.
- Smith, A. G. 1978. Environmental factors influencing pupal colour determination in Lepidoptera. I. Experiments with *Papilio polytes*, *Papilio demoleus* and *Papilio polyxenes*. *Proceedings of The Royal Society of London B* 200: 295-329.
- Smith, A. G. 1980. Environmental factors influencing pupal colour determination in Lepidoptera. II. Experiments with *Pieris rapae*, *Pieris napi* and *Pieris brassicae*. *Proceedings of The Royal Society of London* 207: 163-186.
- Smith, D.A.S., E.A. Shoemith & A.G. Smith, 1988. Pupal polymorphism in the butterfly *Danaus chrysippus* (L.): environmental, seasonal and genetic influences. *Biol. J. Linnean Soc.* 33: 17 – 50.
- Smith-Gill, S.J., 1983. Developmental plasticity: developmental conversion versus phenotypic modulation. *Am. Zool.* 23: 47-55.
- Starnecker, G. 1996. Colour preference for pupation sites of the butterfly larvae *Inachis io* and the significance of the pupal melanization reducing factors. *Naturwissenschaften* 83: 474-476.
- Usui Y, Yamanaka A, Islam ATMF, Shahjahan R & Endo K (2004) Photoperiod- and temperature-dependent regulation of pupal beige/black polymorphism in the small copper butterfly, *Lycaena phlaeas daimio* Seitz. *Zoological Science* 21: 835-839.
- Van Dick, H.; E. Matthysen and C. Wiklund. 1998. Phenotypic variation in adult morphology and pupal colour within and among families of the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*. *Ecological Entomology* 23: 465-472.

- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA & Robinson GE (2006) Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314: 645-647.
- West DA & Hazel WN (1982) An experimental test of natural selection for pupation site in swallowtail butterflies. *Evolution* 36: 152-159.
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, USA.
- White RR (1986) Pupal mortality in the bay checkerspot butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). *The Journal of Research on the Lepidoptera* 25(1): 52-62.
- Wiklund C (1975). Pupal colour polymorphism in *Papilio machaon* L. and the survival in the field of cryptic and non-cryptic pupae. *Trans.Royal Entomol. Soc. London* 127: 73-84.

Anexo 1

Seleção Para Fenótipos Extremos na Coloração da Pupa em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Um dos objetivos propostos para este projeto de doutorado foi determinar a quantidade de locos que segregam para a cor da pupa através do cruzamento de linhagens claras e escuras para a coloração da pupa. Com o transcorrer do experimento constatou-se, o que já havíamos previsto, que o tempo necessário para a conclusão deste objetivo, excedia o tempo de duração das estações favoráveis ao desenvolvimento de *Heliconius erato phyllis*, ou seja, oito meses. Porém, a prévia solução encontrada (manutenção de genitores, para ambas as linhagens formadas, em insetários montados dentro de laboratório) não obteve sucesso, devido à baixa atividade das borboletas e subsequente morte. Desta forma, apresento aqui apenas os resultados relativos à primeira parte do experimento: a seleção para pupas de cor clara e seleção para pupas de cor escura.

O experimento consistiu na manutenção de adultos, previamente escolhidos devido a fenótipos extremos para a cor da pupa, em insetários. Um deles foi escolhido para abrigar apenas indivíduos provenientes de pupa clara e o outro para abrigar indivíduos provenientes de pupa escura. Os adultos foram alimentados com uma mistura de mel, água e pólen. Os ovos foram coletados diariamente e acondicionados em potes plásticos translúcidos com tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro), sendo o fundo coberto com papel absorvente branco; a uma temperatura de 25°C com luz constante. As lagartas foram alimentadas com *Passiflora suberosa*. Após a formação das pupas escolhiam-se os fenótipos extremos, para quando da emergência do adulto, estes fossem

para o respectivo insetário. O procedimento descrito foi válido para as duas linhagens. Devido ao fato de que as fêmeas iniciais, para cada linhagem, não eram endocruzadas ou irmãs, considerou-se que cada linhagem formada nem sempre era constituída de indivíduos endocruzados. A opção por este processo aleatório teve a intenção de diluir o valor de F, visto que, em outros experimentos, o cruzamento entre irmãos proporciona uma alta mortalidade na prole. Durante este processo de seleção, as exúvias dos indivíduos gerados foram armazenadas e categorizadas conforme *Ferreira et. al.* (2006).

Apenas uma análise preliminar foi feita, com a intenção de mostrar o efeito da seleção durante o transcorrer do experimento. Assim, as linhagens constituídas, cada uma, de 138 exúvias foram divididas em 6 grupos, onde cada grupo foi formado por 23 exúvias. A formação dos conjuntos baseou-se na ordem de oviposição. Desta forma, o conjunto 1 foi formado pelos 23 primeiros ovos que se desenvolveram até o estágio adulto. O conjunto 2 pelos 23 ovos seguintes e assim sucessivamente até o conjunto 6. A tabela 1 mostra as médias e seus desvios para a linhagem clara. A tabela 2 mostra estes parâmetros para a linhagem escura.

A decrescente média mostrada para a seleção clara e a crescente mostrada para a seleção escura indica que obtivemos sucesso neste processo de seleção para as duas linhagens. Porém, através dos valores dos desvios padrão, constata-se que a variância, em ambas as linhagens, ainda está alta. Isto pode ser um indicativo que seja necessário continuar o processo de seleção por um tempo maior a fim de se obter um valor menor para a variância.

Ambos os processos de seleção mostram um valor não esperado para os conjuntos 6. A única anomalia verificada durante o processo de seleção foi uma contaminação pelo vírus de poliedrose nuclear. Uma investigação preliminar não indica associação entre os

indivíduos infectados e a coloração da pupa (Anexo 2). Porém outros experimentos são necessários para resultados mais conclusivos.

Referência Bibliográfica

Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.

Tabela 1: Médias dos escores referentes a seis conjuntos, de 23 indivíduos cada, formados pela ordem de oviposição na linhagem clara. Observa-se a ordem decrescente das médias com o transcorrer do tempo, exceção para o conjunto 6.

Conjunto	Média	Desvio Padrão
1	3,35	0,775
2	3,26	0,689
3	3,22	0,422
4	2,87	0,694
5	2,57	0,728
6	3,22	1,043
Total	3,08	0,784

Tabela 2: Médias dos escores referentes a seis conjuntos, de 23 indivíduos cada, formados pela ordem de oviposição na linhagem escura. Observa-se a ordem crescente das médias (no tempo) entre os conjuntos 2 e 5.

Conjunto	Média	Desvio Padrão
1	4,00	0,905
2	3,87	0,920
3	4,09	0,949
4	4,48	0,790
5	4,91	0,417
6	4,83	0,491
Total	4,36	0,862

Anexo 2

Análise da influência do vírus de poliedrose nuclear (VPN) na melanização de pupas e sobrevivência de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae) ¹

Durante um processo de seleção para pupa de cor clara (linhagem clara) e para pupa de cor escura (linhagem escura), em *Heliconius erato phyllis* formaram-se pupas com fenótipo escuro no final do processo de seleção para a linhagem clara, as quais não eram mais esperadas. As médias indicadas na tabela 1, do anexo 1 (página 113) referem-se a seis conjuntos, de 23 indivíduos cada, formados pela ordem de oviposição da linhagem clara. A ordem decrescente das médias com o transcorrer do experimento é interrompida com o valor do conjunto 6. Uma investigação preliminar deste fato apontou que o aumento na frequência de pupas escuras na linhagem clara, coincidiu com um período de contaminação, nos estágios imaturos, pelo vírus de poliedrose nuclear (VPN).

A fim de verificar uma eventual ação viral, pelo VPN, na modificação da coloração das pupas em *H. erato phyllis* foram realizados experimentos em uma irmandade. Os adultos mantidos em insetário (2m x 2m x 3,5), foram alimentados com uma mistura de mel, água e pólen. Os ovos foram coletados diariamente e acondicionados em potes plásticos translúcidos com tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro), sendo o fundo coberto com papel absorvente branco; a uma temperatura de 25°C com um fotoperíodo de 12L:12E. As lagartas foram alimentadas com *Passiflora suberosa*. A partir dos imaturos desta prole, dois grupos de lagartas, chamados controle e infectado foram formados. O grupo infectado, no início do 4º ou 5º ínstar, foi colocado em um pote

¹ Este trabalho foi feito em colaboração com o Prof. Dr. Josué Sant'Ana e Julie Graziela Zanin.

totalmente branco (3 cm de altura por 2 cm de diâmetro) que continha um disco de *P. suberosa* de aproximadamente 2 cm de diâmetro. Sobre a superfície deste disco foi colocado 100 µl de solução viral (concentração de 10^7 poliedros/ml). As lagartas permaneciam neste pote até consumirem todo o disco, sendo após novamente colocadas no pote padrão de criação. Os indivíduos do grupo controle, também foram transferidos para o mesmo tipo de pote, com um disco de *P. suberosa*, porém sobre este foi colocado 100 µl de água e ali permaneciam até consumirem todo o disco foliar.

Foram amostrados 80 indivíduos, sendo 40 para cada grupo. Destes 80, 46 estavam no 5° instar de desenvolvimento, e 34 no 4° instar. O escore de melanização das pupas (descrito por Ferreira *et al.*, 2006) foi feito 24h após a formação desta. Os fenótipos de cor das pupas foram agrupados em duas categorias: claro (escores 2 e 3) e escuro (escores 4 e 5). Foi utilizado o teste qui-quadrado para avaliar a associação entre a coloração da pupa e os indivíduos infectados. Os valores obtidos não foram significantes ($\chi^2=1,966$; 1g.l.; $p = 0,161$ – com correção de Yates). Testamos também, os efeitos do vírus em relação aos fatores mortalidade e tempo de desenvolvimento. Em relação à mortalidade as lagartas infectadas no 4° instar tiveram uma maior mortalidade do que as infectadas no 5° instar ($\chi^2=6,547$; 1g.l.; $p= 0,011$ – com correção de Yates; $\Phi=-0,46$). A mesma comparação entre os controles não se revelou significativa ($\chi^2=0,886$; 1g.l.; $p= 0,347$ – com correção de Yates). Uma comparação entre a mortalidade total dos infectados com os respectivos controles mostrou-se altamente significativa ($\chi^2=15,622$; 1g.l.; $p= 0,0001$ – com correção de Yates). A média do tempo de desenvolvimento ovo-pupa entre os controles foi de $16,29 \pm 4,33$ dias, enquanto que a dos infectados foi de $16,61 \pm 3,38$; essa diferença não foi estatisticamente significativa ($t= -0,62$; 63 g.l.; $p> 0,4$).

Os resultados mostrados não indicam associação entre a coloração da pupa e contaminação por VPN. Porém, estes valores referem-se apenas a uma irmandade e são necessários novos testes. Esta perspectiva é estimulada pelo fato de que ocorrem entre as pupas do grupo infectado, uma frequência maior de fenótipos escuros que chegaram ao estágio adulto. Esta situação, caso recorrente e significativa, pode indicar que o desenvolvimento de pupas melânicas estaria ligado a mecanismos de defesa contra o VPN. Situação semelhante à proposta foi encontrada por Gershenzon (1994) onde as formas melânicas da mariposa *Antheraea pernyi* mostraram maior resistência ao VPN.

O estágio de infecção mostrou-se altamente associado com a chance de sobrevivência do indivíduo. Isto pode ter ocorrido por dois motivos que podem estar atuando em conjunto ou de forma isolada. O primeiro propõe que a infecção em um estágio menor permite um tempo maior para o VPN atuar sobre o organismo e conseqüentemente não permitindo que este alcance o estágio adulto. A segunda hipótese relaciona-se ao sistema imune, o qual poderia ser menos eficiente quanto menor o estágio de desenvolvimento.

Desta forma o presente estudo deixa abertas perspectivas de estudo para uma melhor avaliação desta situação e seus possíveis desdobramentos.

Referência Bibliográfica

Ferreira AF, Garcia RN & Araújo AM (2006) Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica* 126: 133-140.

Gershenson SM (1994) A melanistic form of the oak silkworm *Antheraea pernyi* (Lepidoptera, Attacidae). *Vestnik Zoologii* 6: 46-51.

Anexo 3

Fenótipo Incomum em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)²

Neste artigo reportamos o primeiro caso de *Heliconius erato phyllis* com ausência completa das cores vermelha e amarela nos imagos. Esta borboleta é conhecida por possuir uma coloração aposemática que se caracteriza por uma mancha vermelha e uma listra amarela nas asas anteriores e, nas asas posteriores, uma barra amarela. No lado ventral, abaixo desta barra, a existência de pequenos pontos vermelhos denominados *red raylets* e na extremidade pequenas manchas amareladas constituem o chamado “retângulo creme”. Todas as características citadas estão dispostas sobre um fundo preto (Figura 1a).

Os indivíduos com o padrão de coloração alterado surgiram em uma prole reservada para testes fisiológicos. A fêmea estava ovipositando em insetário (2m x 2m x 3,5m) e seus ovos sendo recolhidos diariamente e acondicionados em potes plásticos translúcidos e com tampa branca (8,5 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro), sendo o fundo coberto com papel absorvente branco, submetidos a uma temperatura de 25°C com luz constante e alimentados com *Passiflora suberosa*. Desta prole emergiram nove imagos que apresentaram o fenótipo descrito logo a baixo.

A região das asas, da cabeça, do tórax e do abdômen que deveriam conter escamas amarela ou vermelha apresentavam estas em tons de branco (Figura 1b). Os olhos, normalmente pretos, mostraram-se menos pigmentados, apresentando-se na cor marrom claro. A ausência de pigmentos vermelho e amarelo no padrão de coloração externo sugeriu que estes fossem ausentes também em estruturas internas. Sabendo que os

² Este trabalho foi feito em colaboração com André Klein.

testículos de Lepidoptera são pigmentados, dissecaram-se dois machos com estas alterações fenotípicas no padrão de coloração e mais um terceiro, da mesma prole, que apresentava fenótipo normal. Neste último, os testículos eram avermelhados, enquanto que nos primeiros eram completamente brancos (Figura 1c). Além da ausência de coloração, seis, entre os nove indivíduos, não foram capazes de distender corretamente as asas, sendo incapazes de voar. Por fim, em apenas um dos imagos com o fenótipo de cores alterado, constatou-se uma alteração morfológica nas antenas. Enquanto que o formato normal é o filiforme, neste, as extremidades eram “falciformes” na extremidade apical (Figura 1d).

A eclosão do primeiro imago com este fenótipo foi casualmente registrada em vídeo enquanto se realizavam observações em viveiro referentes a um estudo sobre o comportamento sexual desta espécie. Este indivíduo, uma fêmea, não conseguiu estender as asas. Fato registrado em vídeo que posteriormente analisado, permitiu a constatação de que as asas ficaram presas no interior da exúvia por um determinado tempo, impossibilitando que as asas fossem corretamente estendidas.

Durante a mesma observação relatada acima, cerca de 20 minutos após o início da eclosão, quando a fêmea aberrante já havia se separado completamente da exúvia, mas ainda permanecia pendurada a alguns centímetros dela, um dos machos que estavam no viveiro se aproximou, inspecionou a fêmea brevemente, pousou e iniciou a cópula, tendo sido este evento também filmado. Este tipo de acasalamento caracteriza o que se denomina “cruzamento-pupal”, típico de algumas borboletas do gênero *Heliconius* (Deinert, 1994; Brower, 1997). A separação do casal se deu entre 125 e 160 minutos após o início da cópula. A fêmea foi recolhida e constatou-se que ela estava com o cheiro característico das fêmeas férteis desta espécie, resultante de um composto antiafrodisíaco transferido pelo macho durante a inseminação (Gilbert, 1976). A fêmea foi mantida em laboratório dentro

de uma gaiola de 60x30x30 cm durante 5 dias, junto a um ramo da planta hospedeira, *P. suberosa*, e um alimentador com mistura de água, mel e pólen. Devido à deformação nas asas, esta borboleta era incapaz de voar e, pela redução de pigmentos nos olhos, aparentemente tinha a visão prejudicada. Conseqüentemente este indivíduo não se alimentava sozinho, sendo necessário fazê-lo artificialmente. Após a morte a fêmea foi dissecada para verificar a existência de ovos em seu abdômen. Porém, nenhum foi encontrado.

Dois imagos com o fenótipo incomum, que estenderam normalmente as asas, foram colocados em um viveiro, sendo possível observar seu comportamento. Na maior parte do tempo, eles permaneciam em pouso, caminhando para se deslocar. Quando levantavam vôo, este era rápido, geralmente em uma única direção e freqüentemente resultava no choque contra os limites do viveiro. Além disso, estas borboletas não se aproximaram dos alimentadores, nas cores vermelho e amarelo que deveria atraí-los. Estes dois indivíduos apenas se alimentavam quando eram colocados sobre os alimentadores. Estas observações, juntamente com a da fêmea que mantivemos em laboratório, citada acima, sugerem uma deficiência grave na visão destes indivíduos.

Uma fêmea com este fenótipo incomum, mas com as asas normalmente distendidas, foi introduzida em um viveiro contendo apenas machos da mesma espécie e com fenótipo normal. Durante o tempo de observação, não houve interação com esta fêmea. A fim de comparação, foi introduzida uma outra fêmea, virgem, com fenótipo normal, no mesmo viveiro, porém sem retirar a fêmea atípica. Durante o período de observação, os machos interagiram apenas com a fêmea normal, mesmo estando a fêmea atípica próxima (<40 cm). Apesar de ter sido única, esta observação sugere que a ocorrência da cópula, logo após a eclosão, com uma fêmea igualmente anormal e, ainda, sem a distensão correta das

asas foi desencadeada essencialmente por uma sinalização química da fêmea, já que a forma visual dificilmente seria reconhecida como co-específica pelo macho.

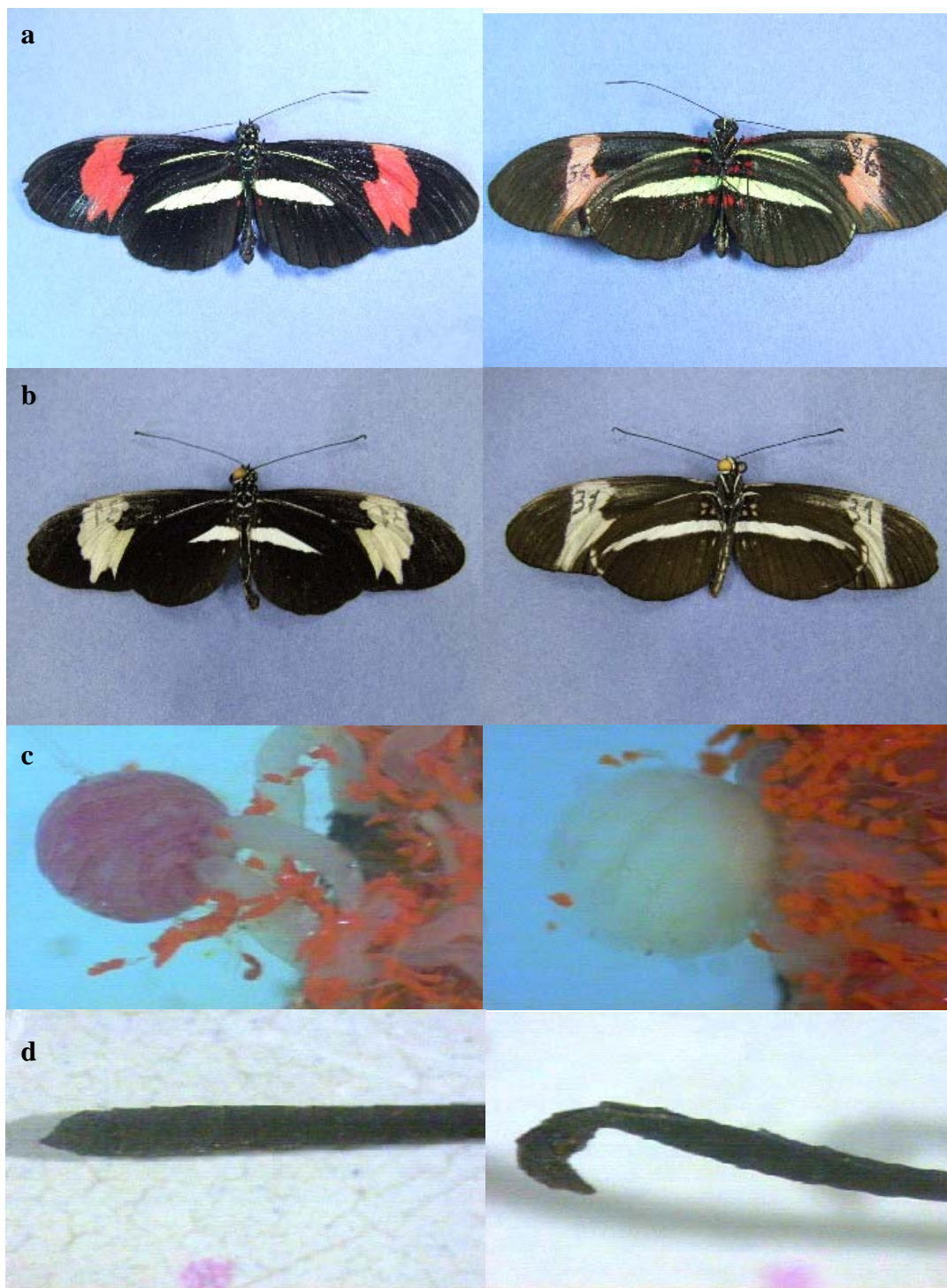
A prole na qual apareceram estas borboletas com fenótipo incomum muito provavelmente se originou de um endocruzamento. Um total de 49 ovos foram ovipositados. Destes, dois não resultaram em larvas, três morreram em primeiro instar, dois em segundo e sete em estágio de pupa. Além disso, seis larvas foram usadas em testes de fisiologia, das quais apenas uma sobreviveu, tendo eclodido um imago com o fenótipo aqui relatado. Trinta indivíduos atingiram a fase de imago e, destes, nove apresentavam o fenótipo alterado. Esta proporção se aproxima de $\frac{1}{4}$, o que seria esperado se tal fenótipo fosse causado por uma mutação recessiva em um sistema simples de 1 loco e 2 alelos.

No gênero *Heliconius*, os omocromos são uma importante classe de pigmentos que derivam do triptofano. Um dos intermediários desta via, a 3-OH-quinurenina, é responsável pelo amarelo das asas. A partir deste pigmento é sintetizada a xantomatina que, quando oxidada, gera di-hidroxantomatina, responsável pelo vermelho nas asas (Nijhout, 1991). É provável que a mutação que resultou no fenótipo aqui apresentado tenha afetado alguma enzima que catalise uma reação intermediária entre o triptofano e a 3-OH-quinurenina, interrompendo a síntese de ambos os pigmentos, amarelo e vermelho.

Referências Bibliográficas

- Brower, A.V.Z. (1997) The evolution of ecologically important characters in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a cladistic review. **Zoological Journal of the Linnean Society**. 119: 457-472.
- Deinert, E.I., Longino, J.T. & Gilbert, L.E. (1994) Mate competition in butterflies. **Nature** 370: 23-24.
- Gilbert, L. (1976) Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed antiaphrodisiac? **Science** 193: 419-420.
- Nijhout, H.F. (1991) **The Development and Evolution of butterfly Wing Patterns**. Washington: Smithsonian Institution Press, USA

Figura 1: a) Vista dorsal e ventral de *H. e. phyllis* normal. b) Vista dorsal e ventral de *H. e. phyllis* com padrão de cores alterado. c) Testículo norma (esquerda) e sem pigmentação (direita). d) Antena normal (esquerda) e falciforme (direita).



Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects

Adriano Andrejew Ferreira, Rosane Nunes Garcia & Aldo Mellender de Araújo*

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil; *Author for correspondence (Phone: +55-51-33166729; Fax: +55-51-33167311; E-mail: aldomel@portoweb.com.br)

Key words: butterfly, environmental effect, heritability, melanization, pupal colour

Abstract

This paper deals with estimates of heritability and the effect of two different kinds of environment on the melanization of pupae in the butterfly *Heliconius erato phyllis*. The results for heritability showed greater differences when the offspring were regressed on male or female values for pupal colour. Pupal colour followed a system of discrete scores, from 2 for the light pupae to 5 for the darkest one. Estimate of the heritability (h^2) was 0.44 when the average score of the siblings were regressed on the mid-parental value. When regressed on the male parent, h^2 was larger (0.54), being very low when regressed on the female parent (0.09). Estimate by the analysis of variance was also 0.44 when both male and female sibs were included in the analysis (for male sibs, $h^2=0.43$ and for female sibs, 0.47). To test for the effect of the environment, each brood was divided in three, one being the control, the second subjected to a black environment when reaching the fifth instar and the third to a white environment. Those in the black environment originated dark pupae that scored 5 or 4; for those in the white environment, there was no difference with the controls. Caterpillars when entering the prepupal stage were also subjected to the black treatment (early and late prepupal stage, respectively, for treatments called black A and black B). A significant effect was observed only when early prepupal stage was subjected to the black environment.

Introduction

The pupal stage in butterflies, due to its immobility is an easy potential target for visually oriented predators. It would be expected that, for each species, its pupal colour could result from an adaptive process where some sort of genetic-environmental interaction could evolve in order to increase its inconspicuousness. As a consequence, pupae should acquire a different pigmentation according to environmental cues detected by the caterpillars and to the genetic capabilities to respond to those cues (Hazel & West, 1979). Actually, lepidoptera pupae which are not covered by cocoons or hidden in the ground show an intense integumental colouration (Starnecker, 1996). A large body of data on pupal colour in butterflies

have been published, mainly on species of the families *Pieridae* (Kayser & Angersbach, 1974; Ressin, 1980; Smith, 1980), and *Papilionidae* (Hazel & West, 1979, 1982, 1983; West & Hazel, 1982, 1985; Sims, 1983; Hazel, Ante & Stringfellow, 1998). Recently a number of studies of a few species of *Nymphalidae* have also been published (Bückmann & Maisch, 1987; Maisch & Bückmann, 1987; Smith, Shoesmith and Smith, 1988; Starnecker et al., 1994; Starnecker, 1996, 1997; Starnecker & Bückmann, 1997; Van Dyck, Matthysen & Wiklund, 1998). These studies dealt with physiological aspects involved in pupal colouration and their adaptive significance in different evolutionary scenarios.

The genus *Heliconius*, essentially a Neotropical one, is being studied for a long time by many

researchers around the world (see, for instance, Brown Jr., 1981; Penz, 1999; Jiggins et al., 2001). As for *Heliconius erato phyllis* Cramer, this subspecies has been the object of study by different research groups in Brazil (Silva & Araújo, 1994; Ramos & Freitas, 1999; Rodrigues & Moreira, 1999). The objective of the present study was to evaluate the contribution of both, the genetic background as well as different environments imposed to caterpillars, on the intensity of melanization in pupae of *Heliconius erato phyllis* from Southern Brazil. In nature, its pupae show a chromatic variation that ranges from an almost white colour until a black one, being a case of quantitative variation instead of polymorphism (the latter being referred to some *Papilionidae* and *Pieridae*). In this paper we provide estimates of heritability of the pupal colour pattern and we also compare the effects of two treatments corresponding to a white and a black environment. This study is the first one reported for the subject in a Neotropical butterfly.

Materials and methods

The butterfly *Heliconius erato phyllis* is a subspecies which lives mainly in Eastern and Southern Brazil. It has a black background colour-pattern with red patches in the forewings and a yellow bar in the hindwings. Below the yellow bar there is a series of red raylets, which can vary from 1 to 7 (Pansera & Araújo, 1983). The present research was done with butterflies from the surroundings of Porto Alegre, capital of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Initially females and males were caught in the wild and brought to the insectary for laying eggs and to cross with virgin females, respectively. Crosses were made taking into account their degree of relatedness (offspring inbreeding coefficients of 0; 0.125; 0.25; and 0.375). Adults were maintained in insectaries measuring 200 × 200 × 220 cm and received daily moisture of honey, water and pollen; these insectaries had plenty of vegetation and hostplants for oviposition – *Passiflora suberosa*, *P. misera* and *P. capsularis*.

Eggs were collected daily and put individually in translucent plastic pots (8.5 cm height and 7.5 cm diameter) with white top and bottom covered with beige paper. All preadult development

was done with permanent light and at a temperature of 25 ± 1°C. Larvae were fed daily with *Passiflora suberosa* and *P. misera*; this procedure was taken as the *control* treatment.

To test the effect of environmental alteration, each brood was partitioned in three groups: control (already described), darkness and whiteness. In the darkness treatment (*black* treatment from now on) the plastic pots were totally covered with black paper at the external surface of the pot (the white top was covered by black from inside), with caterpillars being transferred to these pots in the beginnings of their 5th instar. In the *white* treatment the plastic pots were, on the contrary, covered with white paper, the remaining being essentially identical. Caterpillars subjected to each treatment were full sibs. Once the results showed that the control and white treatments were not statistically different, they were pooled. In order to get more details on the time the caterpillars were sensible to the darkening of environment, two variants of the black treatment were done: in the first, which we called *black A*, larvae in early prepupal stage, when the caterpillar eliminates the content of the digestive tract and changes progressively its background colour from white to pink, were subjected to the black environment. The other variant, *black B*, consisted of introducing larvae in late prepupal stage (when they adopt a hanging position) to the black environment.

The amount of melanization of each pupa was scored in discrete units as 2 (the most light colour) until 5 (the darkest one); scoring was done by comparing each pupal exuviae with a standard on a white sheet of paper. Heritability estimates (h^2) were done by the conventional methods of regression and analysis of variance. The sibling average score for pupal colour was regressed first to the mid-parental value; a second regression was between the average score of the siblings on the male value, and a third regression on the female value. Estimates of the heritability taking each sex separately (siblings) was also made. As for the heritability estimates using the analysis of variance, we employed the method suggested in McWhirter (1969), to whom $h^2 = 2\sigma_B^2 / (\sigma_A^2 + \sigma_B^2)$, where σ_B^2 is the variance between-sibships, and σ_A^2 the within-sibships variance. Standard deviation of the heritability estimates were calculated as suggested by Fakoner (1989) and Becker (1975).

Results

Genetic Component

In the whole, 28 sibships were used in this study (Table 1). The number of caterpillars in each sibship ranged from 13 to 66, with an average of 33 individuals. The results shown in that table are all due to the control treatment. Four of the 28

Table 1. Mean score for pupal colour (\pm standard deviation) in the broods from females caught in nature and from matings in insectary. The scores for pupal colour in the parents, when available, are also shown

Broods	n	F	Parent's pupal colour		Brood's pupal colour Mean \pm s.d.
			Male	Female	
1	43	0 ^a	nature	nature	3.42 \pm 1.00
2	52	0	3	4	3.37 \pm 0.67
3	50	0.250	3	3	3.62 \pm 0.62
4	20	0.375	4	5	3.20 \pm 0.42
5	64	0 ^a	nature	nature	3.05 \pm 0.52
6	22	0.250	undet. ^b	3	3.04 \pm 0.49
7	29	0	nature	4	2.97 \pm 0.62
8	66	0	nature	3	3.29 \pm 0.67
9	37	0	undet. ^b	4	3.86 \pm 0.54
10	19	0 ^a	nature	nature	4.00 \pm 0.67
11	40	0	5	3	4.48 \pm 0.75
12	23	0.125	5	5	3.86 \pm 0.90
13	17	0 ^a	nature	nature	4.23 \pm 0.81
14	42	0	nature	4	4.14 \pm 0.75
15	13	0 ^a	nature	nature	3.15 \pm 0.38
16	14	0 ^a	nature	nature	3.07 \pm 0.27
17	45	0 ^a	nature	nature	3.71 \pm 0.82
18	42	0 ^a	nature	5	3.90 \pm 0.79
19	46	0 ^a	5	5	3.59 \pm 0.75
20	51	0 ^a	nature	nature	3.61 \pm 0.83
21	33	0	nature	5	3.70 \pm 0.77
22	29	0	3	3	3.59 \pm 0.73
23	27	0 ^a	5	5	3.26 \pm 0.59
24	37	0 ^a	5	4	3.86 \pm 0.82
25	30	0 ^a	4	3	4.00 \pm 0.87
26	43	0 ^a	4	3	3.88 \pm 0.85
27	20	0	3	5	4.15 \pm 0.81
28	35	0	3	3	3.43 \pm 0.78

F=offspring inbreeding coefficient; n= number of individuals per brood.

^aF value unknown, supposed to be zero.

^bundet. = undetermined.

broods were inbred (# 3, 4, 6, and 12). Although they were discarded in the estimates of heritability, they show an interesting tendency which is suggestive of a heritable component in the degree of melanization of the pupa: the variance of the sibship mean score decreases as the F value increases (considering F values of 0.125, 0.250—two sibships—and 0.375 their variance were respectively equal to 0.81, 0.34—weighted average—and 0.18). Altogether, the weighted mean variance for these four inbred broods were equal to 0.40; for the remaining 24 non-inbred sibships, the weighted mean variance of the scores was 0.50 which although numerically larger is not significantly different from the former value ($0.25 < p < 0.50$).

To estimate the heritable component in the melanization of the pupa, the methods of regression and analysis of variance were used (Table 2 and Figure 1 for the scatter diagrams). When regression is used, it is possible to calculate nine values for h^2 , as shown in the table, depending on whether both sexes are taken together or not. One interesting feature of these results is the fact that when the score of the offspring was regressed on the female parent, the values for heritability were extremely low (Table 2, third column). However, none of the nine estimates of h^2 by regression were significantly different from zero, although three of them were close to significance (p approximately 0.06 or 0.08). Heritabilities estimated by the analysis of variance are consistent with those given by the regression on mid-parental value (Table 2, last column). Detailed results of the two-factor analysis of variance (sex and brood) for the control treatment, are shown in Table 3; there is significant differences between broods, no sexual differences in the score of melanization and no interaction $sex \times brood$. Similar results were obtained for those sibships submitted to the black environment (Table 4). In this particular case, it is interesting to note that even showing a strong effect on the melanization of the pupae, the black environment was not sufficient to suppress possible genetic differences among the broods ($F=8.796$; $p=0.029$).

Environmental component

When caterpillars in the fifth instar were transferred to pots with a black environment, the score of the resulting pupae were 5 or eventually 4,

Table 2. Heritability estimates by the methods of regression and analysis of variance (inbred broods not included). Total number of broods used in parenthesis

Sibship	Regression (Parent×offspring)			ANOVA
	Mid-parental value	Male parent	Female parent	
Mean	0.44 ± 0.24 (8)	0.54 ± 0.27 (8)	0.09 ± 0.29 (14)	0.44 ± 0.11 (19)
Males	0.36 ± 0.15 (7)	0.43 ± 0.20 (7)	0.08 ± 0.28 (13)	0.43 ± 0.15 (19)
Females	0.47 ± 0.32 (7)	0.49 ± 0.41 (7)	0.12 ± 0.33 (13)	0.47 ± 0.16 (19)

Table 3. Analysis of variance for the 19 broods used as control treatments (25 ± 1°C – no darkening of the environment)

Source	SS	df	MS	F	p
Sex	0.150	1	0.150	0.218	0.646
Error	14.661	21.226	0.691		
Broods	94.302	18	5.239	7.389	0.001
Error	12.762	18	0.709		
Interaction (SxB)	12.762	18	0.709	1.335	0.160
Error	300.649	566	0.531		

Table 4. Analyses of variance for five broods used as black treatment (25 ± 1°C – caterpillar environment totally darkened from the 5th instar)

Source	SS	df	MS	F	p
Sex	0.063	1	0.063	0.831	0.413
Error	0.302	4.013	0.075		
Broods	2.646	4	0.662	8.796	0.029
Error	0.301	4	0.075		
Interaction (SxB)	0.301	4	0.075	0.278	0.892
Error	26.308	97	0.271		

indicating a strong influence in the melanization of the pupa. However, when fifth instar larvae were transferred to a white environment, the pupal score did not differ from those under the control treatment. Eight broods were used in these comparisons and the detailed results are shown in Table 5. As can be seen, all but one (brood # 15) of the comparisons black×control showed significant differences, while all comparisons between black×white were significantly different. As for the white×control comparison, none were significant.

In order to get more information on the critical period inducing the melanization of the pupa,

caterpillars subjected to the black treatment were separated in two groups, according to the beginnings of the black environment, whether in early prepupal stage (the caterpillar changes its background colour from white to pink and eliminates the content of the digestive tract – treatment here called black A) or in late prepupal stage (caterpillar adopts a hanging position –black B). The results, shown in Table 6, indicate that late prepupal stage is no longer sensitive to the black treatment. The critical period is then somewhere between the beginning of the fifth instar and early prepupal stage.

Discussion

Why should the pupa in butterflies be of different morphs, as far as colour is concerned? Presumably to become less conspicuous to predators, increasing their chances of survival. This variation in pupal colour and its meaning for survival is known since the 19th century as referred to by Ford (1975) and Hazel (1995). It is possible to distinguish three kinds of plasticity, not mutually exclusive, in relation to pupal colour (particularly for the *Papilionidae*, where most studies have been done), namely *environmentally cued polymorphism* (Sheppard, 1975), *phenotypic modulation* (Smith-Gill, 1983) and *seasonal polyphenism* (Shapiro, 1976). The case of *Heliconius erato phyllis*, here reported, does not correspond either to a seasonal polyphenism or environmentally cued polymorphism; it could be placed, however, in the phenotypic modulation category. It is not a polymorphism since the variation observed in *H. e. phyllis* is continuous, not discontinuous; nor a polyphenism as more than one phenotype is observed throughout all seasons. In our experiments, scores for pupal melanization varied from 2 (light) until 5

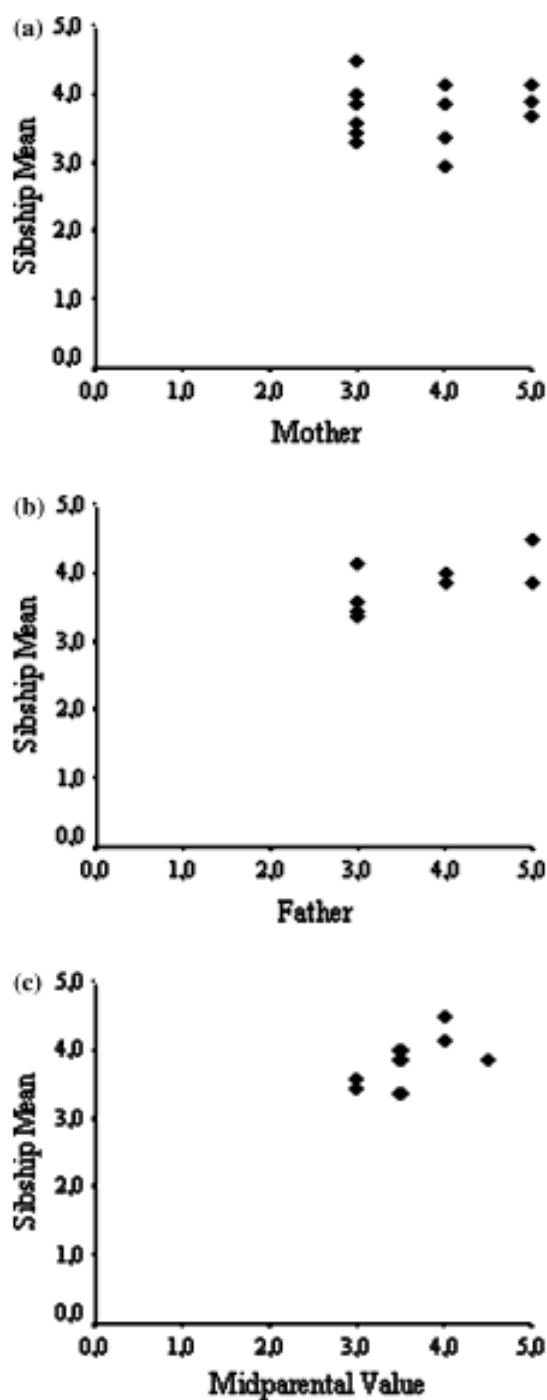


Figure 1. Regression of the mean score of brood for the degree of pupal melanization on respectively, mother score (a), father (b), and mid-parental value (c) in *Heliconius erato phyllis*. Scores ranged from 2 to 5 in increasing order of melanization.

Table 5. Analyses by Chi-square between treatments

Broods	Treatment Comparison								
	Black×Control			White×Control			Black×White		
	χ^2	d.f.	n	χ^2	d.f.	n	χ^2	d.f.	n
14	21.000***	2	42	1.289	2	42	18.828***	2	42
15	5.652	2	9	1.523	2	13	6.430*	2	10
16	6.113*	2	16	0.608	2	14	6.100*	2	12
17	24.380***	2	44	4.957	2	45	12.306**	2	45
18	22.714***	2	42	3.123	2	42	11.446**	2	42
19	15.964***	2	44	3.370	2	46	19.954***	2	46
20	10.883**	2	52	3.884	3	51	17.320***	3	41
21	16.058***	2	42	–	–	–	–	–	–

*, **, *** – significance, respectively at 0.05, 0.01 and 0.001.

Table 6. Analyses by Chi-square between different black treatments and controls (see Materials and Methods for details)

Broods	Treatment comparison								
	Black A×Control			Black B×Control			Black A×Black B		
	χ^2	d.f.	n	χ^2	d.f.	n	χ^2	d.f.	n
21	20.636***	2	52	–	–	–	–	–	–
22	6.967*	2	36	0.681	2	40	7.781*	2	18
23	–	–	–	1.805	2	34	–	–	–
24	9.069*	2	44	1.965	2	57	11.852**	2	27
25	–	–	–	6.574	3	46	–	–	–

*, **, *** – significance, respectively at 0.05, 0.01 and 0.001.

(dark pupa); whenever fifth instar larvae were subjected to a total dark environment, the resulting pupae scored as 5, sometimes as 4. On the other hand, fifth instar larvae subjected to a white environment scored similarly to the controls. In a second round of experiments, dealing only with black environment, we were able to show that the critical period that induces the melanization is between the fifth instar and early prepupal stage (late prepupal stage, i.e. when the caterpillar adopts a hanging position, is insensitive to the changing environment). At present we are trying to get detailed informations on the different stages of development to increase the accuracy of our data. Moreover, experiments on the production of the pupal melanization reducing factor (PMRF) in different larval instars and its physiological role

are in progress. This hormone was identified in another nymphalid species, *Inachis io* (Bückmann & Maisch, 1987), in *Pieris brassicae* (Pieridae; Kayser & Angersbach, 1974) and in *Papilio polyxenes* (Papilionidae). However, in the latter, it results in a dark pupa (Starnecker & Hazel, 1999).

Our results dealing with the genetic component of pupal melanization are compatible with a polygenic control, with a strong environmental influence. Estimates of heritability by the method of the analysis of variance ranged from 0.43 to 0.47. The examination of the frequency distributions of the scores in the different sibling families (not shown here) do not indicate any dominance effect. When the regression was used, values of heritability are very similar to those of the analysis of variance, except when the female (mother) score

is used (Table 2). It is difficult to interpret such results; there seems to be no influence of sex chromosomes, because both sexes exhibit almost equal values for heritability, independently of the sex of the parent. Sex linked inheritance was reported by Eilers and Boggs (2002) for wing melanization in *Colias*. A sort of maternal effect could be suggested, since the values for h^2 are very low only when the mother's score is used (range 0.08–0.12); we cannot even reject the possibility of an epigenetic effect due to DNA methylation (this is currently under investigation by our group). Although we have not reported here, independent analysis of other variables, as the number of red raylets in the ventral surface of the hindwings of *H. e. phyllis*, as well as the pupal exuvia weight showed similar discrepancies in heritability when sons or daughters, or their average are regressed on male or female parental value.

A further independent evidence of a genetic component came from those siblings where the parents were close relatives (inbreeding coefficients varying from 0.125 to 0.375): their averaged variance for the pupal scores were smaller than the averaged for the sib families where parents were not related. Taking only inbred offspring, the variance of scores decreased as the inbreeding coefficients increased.

As for the effects of different environments, we were able to show that a white environment does not have an effect on the melanization of pupae; however, when caterpillars were subjected to a dark environment starting in the fifth instar, the resulting pupae were always dark (scoring 4 or 5 in our scale of melanization). Moreover, caterpillars responded differently to the black stimulus depending if they were transferred to this environment in early or late prepupal stage, the later being no longer influenced by the black treatment. This environmental influence could be important for the survival of the pupa, since in nature, before pupation, caterpillars wander freely until choosing a pupation site; so, depending on the place chosen, pupae could be more conspicuous. Field experiments are also being planned to test this hypothesis. At present we are trying to specify at which moment (number of hours) after the start of the fifth instar the caterpillar is sensitive to a colour change in the environment. Finally, our results indicate that a genetic-environmental interaction (about 1:1) is responsible for the var-

iability in the pupal colour of the butterfly *Heliconius erato phyllis*. The results here reported are the first ones which used a Neotropical butterfly, particularly for a species belonging to a genus intensely studied in other ecologic and genetic aspects.

Acknowledgements

We thank our colleague Dr. Helga Winge for providing facilities to rear *Heliconius* butterflies in her greenhouse in the initial stage of this work. Téo Pereira Halfen and Ana Kristina Silva were of invaluable help in keeping caterpillars and adults fed adequately. We also thank Felipe Silva Flores for reviewing the english version and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, for the fellowship to AAF.

References

- Becker, W.A., 1975. Manual of Quantitative Genetics. 3rd edn. Washington State University Press, Washington State University, Pullman, Washington.
- Brown, K.S. Jr., 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 427–456.
- Bückmann, D. & A. Maisch, 1987. Extraction and partial purification of the pupal melanization reducing factor (PMRF) from *Inachis io* (Lepidoptera). *Insect Biochem.* 17: 841–844.
- Eilers, J. & C.L. Boggs, 2002. The evolution of wing color in *Colias* butterflies: heritability, sex linkage, and population divergence. *Evolution* 56: 836–840.
- Falconer, D.S., 1989. Introduction to Quantitative Genetics. 3rd edn. Longman Scientific & Technical, Essex.
- Ford, E.B., 1975. Ecological Genetics. 4th edn. Chapman & Hall, London.
- Hazel, W.N., 1995. The causes and evolution of phenotypic plasticity in pupal color in swallowtail butterflies, pp. 205–210 *Swallowtail Butterflies: Their Ecology and Evolutionary Biology* in edited by J.M. Scriber, Y. Tsubaki & R.C. Lederhouse. Scientific Publishers, Gainesville, Florida.
- Hazel, W.N. & D.A. West, 1979. Environmental control of pupal colour in swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Battus philenor* (L.) and *Papilio polyxenes* Fabr. *Ecol. Entomol.* 4: 393–400.
- Hazel, W.N., D.A. & West, 1982. Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies as a threshold trait: selection in *Eurytides marcellus* (Cramer). *Heredity* 49: 295–301.
- Hazel, W.N. & D.A. West, 1983. The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. *Ecol. Entomol.* 8: 37–42.

- Hazel, W., S. Ante & B. Stringfellow, 1998. The evolution of environmental-cued pupal colour in swallowtail butterflies: natural selection for pupation site and pupal colour. *Ecol. Entomol.* 23: 41–44.
- Jiggins, C.D., R.E. Naisbit, R.L. Coe & J. Mallet, 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* 411: 302–305.
- Kayser, H. & D. Angersbach, 1974. Action spectra for light-controlled pupal pigmentation in *Pieris brassicae*: Melanization and level of bile pigment. *J. Insect Physiol.* 20: 2277–2285.
- Maisch, A. & D. Bückmann, 1987. The control of cuticular melanin and lutein incorporation in the morphological colour adaptation of a nymphalid pupa, *Inachis io* L. *J. Insect Physiol.* 33: 393–402.
- McWhirter, K., 1969. Heritability of spot-number in scillonian strains of the meadow brown butterfly (*Maniola jurtina*). *Heredity* 24: 314–318.
- Pantera, M.C.G. & A.M. Araújo, 1983. Distribution and heritability of the red raylets in *Heliconius erato phyllis* (Lepid.; Nymph.). *Heredity* 51: 643–652.
- Penz, C.M., 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* 127: 277–344.
- Ramos, R.R. & A.V.L. Freitas, 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *J. Lepidop. Soc.* 53: 11–21.
- Ressin, W.J., 1980. The effect of juvenile hormone on pupal pigmentation of *Pieris brassicae* L. *J. Insect Physiol.* 26: 295–302.
- Rodrigues, D. & G.R.P. Moreira, 1999. Feeding preferences of *Heliconius erato phyllis* (Lep.; Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. *J. Lepidop. Soc.* 53: 108–113.
- Shapiro, A.M., 1976. Seasonal polyphenism. *Evol. Biol.* 9: 229–253.
- Sheppard, P.M., 1975. *Natural Selection and Heredity*. 4th edn. Hutchinson and Co, London.
- Silva, L.M. & A.M. Araújo, 1994. The genetic structure of *Heliconius erato* populations. *Rev. Bras. Genét.* 17: 19–24.
- Sims, S.R., 1983. The genetic and environmental basis of pupal colour dimorphism in *Papilio zelicaon* (Lepidoptera: Papilionidae). *Heredity* 37: 236–243.
- Smith, A.G., 1980. Environmental factors influencing pupal colour determination in Lepidoptera. II. Experiments with *Pieris rapae*, *Pieris napi* and *Pieris brassicae*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 207: 163–186.
- Smith, D.A.S., E.A. Shoemith & A.G. Smith, 1988. Pupal polymorphism in the butterfly *Danaus chrysippus* (L.): environmental, seasonal and genetic influences. *Biol. J. Linnean Soc.* 33: 17–50.
- Smith-Gill, S.J., 1983. Developmental plasticity: developmental conversion versus phenotypic modulation. *Am. Zool.* 23: 47–55.
- Starckeck, G., 1996. Colour preference for pupation sites of the butterfly larvae *Inachis io* and the significance of the pupal melanization reducing factors. *Naturwissenschaften* 83: 474–476.
- Starckeck, G., 1997. Hormonal control of lutein incorporation into pupal cuticle of the butterfly *Inachis io* and the pupal melanization reducing factor. *Physiol. Entomol.* 22: 65–72.
- Starckeck, G. & D. Bückmann, 1997. Temporal occurrence of the pupal melanization reducing factor during development of the butterfly, *Inachis io*. *Physiol. Entomol.* 22: 73–78.
- Starckeck, G. & W. Hazel, 1999. Convergent evolution of neuroendocrine control of phenotypic plasticity in pupal colour in butterflies. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 2409–2412.
- Starckeck, G., P.B. Koch, S. Matsumoto, T. Mitsui & D. Bückmann, 1994. Localization of the pupal melanization reducing factor of *Inachis io* (L.) and comparison with melanization and reddish coloration hormone. *Z. Naturforsch. Teil 49c*: 476–482.
- West, D.A. & W.N. Hazel, 1982. An experimental test of natural selection for pupation site in swallowtail butterflies. *Evolution* 36: 152–159.
- West, D.A. & W.N. Hazel, 1985. Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies: timing of the sensitive period and environmental control. *Physiol. Entomol.* 10: 113–119.
- Van Dick, H., E. Matthyssen & C. Wiklund, 1998. Phenotypic variation in adult morphology and pupal colour within and among families of the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*. *Ecol. Entomol.* 23: 465–472.