

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

Fatores Genéticos e Ambientais no Condicionamento  
da Cor da Pupa em *Heliconius erato phyllis*, Fabricius  
1775 (Lepidoptera: Nymphalidae)

Adriano Andrejew Ferreira

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul para obtenção do título de  
Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre, Fevereiro de 2003

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, simplesmente por existir.

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 Elmo Cardoso, além do apoio sempre necessário, pela disponibilidade e pela amizade.

Às secretárias, da pós e graduação, Ellen, Virgínia e Lúcia, pelos serviços prestados.

Ao Teo, Nicolás e Ana Kristina pela ajuda imprescindível no tratamento das larvas e borboletas, além da troca de idéias.

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 pelo espaço cedido em seu laboratório.

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

À Professora Sídia C. Jaques pelo auxílio com programas estatísticos.

## Agradecimentos

---

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo, idéias, discussões e força mútua.

Aos Professores que contribuíram para minha formação.

Ao Professor Tarso Kirst, Departamento de Biofísica IB, pelo auxílio na busca de um colorímetro.

Aos funcionários do centro de controle de qualidade da OPP pela disponibilização e auxílio no manuseio do colorímetro utilizado em teste piloto.

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

---

## SUMÁRIO

Capítulo 1 .....	1
Introdução Geral .....	1
Polimorfismo e variação contínua em adaptações de lepidópteros .....	1
O gênero <i>Heliconius</i> .....	10
Objetivos .....	14
 Capítulo 2 .....	 15
Resultados .....	15
Pupal melanization in <i>Heliconius erato phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae): the contribution of the genotype and of the environment .....	15
 Capítulo 3 .....	 34
Discussão Geral .....	34
Componente ambiental .....	34
Componente genético .....	37
Plasticidade fenotípica e adaptação .....	44
 Resumo e Conclusões.....	 48
 Summary and Conclusions.....	 50
 Referências Bibliográficas .....	 52
 Apêndice .....	 59

## CAPÍTULO 1

### Introdução Geral

#### *Polimorfismo e variação contínua em adaptações de lepidópteros*

Os mecanismos que conduzem à existência de fenótipos discretos alternativos ou estratégias em uma população são freqüentemente classificados como *genéticos* quando diferenças fenotípicas são principalmente o resultado de diferenças genéticas (ex. polimorfismo genético), ou *ambientais* quando os fenótipos são condicionados pelo ambiente (Maynard Smith, 1982). Várias características do ciclo vital dos insetos holometábolos devem representar adaptações a condições ambientais específicas. Em muitas espécies as larvas e as pupas são cripticamente coloridas, podendo as últimas serem tanto monomórficas quanto polimórficas, representando adaptações que tenham evoluído ao longo da história dos insetos (Hazel, 1977).

O estágio pupal, em termos de risco à sobrevivência, é extremamente vulnerável dada a imobilidade da pupa. Pode-se imaginar, portanto, a evolução de características, durante esta fase do ciclo, que confirmam uma maior chance para o indivíduo sobreviver. Dentre estas o polimorfismo na coloração da pupa é o resultado de uma interação genótipo-ambiente na qual a produção de uma pupa com uma determinada cor depende da "sugestão" recebida do ambiente pela lagarta bem como da predisposição genética da mesma em responder a esta "sugestão" (Hazel & West, 1979). Portanto pode-se inferir que o significado

adaptativo do polimorfismo na coloração da pupa está associado, pelo menos, com o ciclo de vida e a ocorrência sazonal da espécie (Wiklund, 1975).

As bases genéticas do polimorfismo controlado ambientalmente e sua manutenção na natureza pela seleção natural são pouco conhecidas (Hazel, 1977). Alguns dos melhores exemplos conhecidos de polimorfismo controlado ambientalmente podem ser encontrados entre os lepidópteros (Merrifield & Poulton, 1899 - *apud* Clarke & Sheppard, 1972; Hazel, 1977). Cada forma é particularmente bem adaptada à um distinto tipo de "background"; muitos experimentos têm mostrado a importância da camuflagem para sobreviver, incluindo a sobrevivência da pupa (Hidaka et al, 1959 - *apud* Hazel, 1977; Baker, 1970; Wiklund, 1975). Assim, as pupas de borboletas que não estão envolvidas por casulos ou escondidas sob o solo, mostram uma intensa coloração do tegumento que adapta-se à cor do "background" do local de empupação (Starnecker, 1996b).

O polimorfismo na coloração das pupas na Superfamília Papilionoidea, aparentemente, desenvolveu-se de forma independente pelo menos quatro vezes: em Papilionidae, Pieridae, Satyridae e Nymphalidae (Wiklund, 1975). Em lepidópteros a primeira correlação feita entre a cor da pupa e a cor do ambiente que a rodeia, foi descrita por Wood em 1867 (*apud* Baker, 1970). A partir desta publicação, o papel de fatores ambientais na determinação da cor da pupa em relação à camuflagem em lepidópteros tem sido estudado por numerosos autores (Smith, 1978), os quais envolvem espécies das famílias Pieridae, Papilionidae e Nymphalidae. Merrifield & Poulton em 1899 publicaram seus resultados enfocando as famílias Pieridae e Papilionidae (*apud* Clarke & Sheppard, 1972). A família Nymphalidae, de quem *Heliconius erato phyllis* é um integrante, tem recebido atenção há aproximadamente duas décadas e os estudos restringem-se a poucas espécies.

A família Pieridae, uma das primeiras a ser estudada no que se refere à coloração da pupa e suas vantagens adaptativas, compreende borboletas de tamanho médio e pequeno, comumente brancas ou amareladas, com manchas pretas nas margens das asas. As pupas são alongadas e estreitas, prendendo-se pelo cremaster (local da pupa que corresponde à porção terminal da larva) e por um fio de seda ao redor do corpo da pré-pupa, entre a região dorsal e subdorsal; sendo esta forma de fixação, segundo Baker (1970), uma adaptação que aumenta o tempo de retirada da pupa do seu local de empupação, aumentando as chances de sobrevivência desta, visto que seus predadores podem ser perturbados por outros animais e obrigam-se a abandonar a atividade de remoção da pupa.

Entre as espécies de pierideos que foram estudadas, a cor da pupa possui uma variação dimórfica, verde ou marrom, com raros intermediários, estes citados por Angersbach e Kaiser (1971). A resposta ao estímulo luminoso é o principal fator na determinação da cor da pupa nesta família (Angersbach & Kayser, 1971; Smith, 1980) sendo o controle da pigmentação afetado por todos os comprimentos de onda estendendo-se do ultravioleta ao infravermelho (Kayser e Angersbach, 1974). Um experimento realizado por Angersbach (1975) indica a importância dos ocelos como receptores do estímulo externo em *Pieris brassicae*, onde a obstrução do denominado “ocelo 1” produzia pupas escuras, sendo os outros cinco ocelos menos influentes no que se refere a este aspecto. Outros fatores como fotoperíodo, temperatura e umidade relativa afetam a coloração da pupa, porém de forma conjunta com outros estímulos e não se aplicam de forma generalizada a todas espécies de pierideos (Angersbach & Kaiser, 1971; Smith, 1980).

Nas pupas de *Pieris* a escolha particular de um local de empupação e a habilidade de modificar a cor de acordo com este local, possivelmente desenvolveram-se devido à vantagem causada pelo decréscimo das chances de serem encontradas (Baker, 1970), comparativamente às que não se camuflavam. Kayser & Angersbach (1974) mostraram que a melanização nas pupas de *P.*



*brassicae* aumenta sob influência de comprimentos de onda menores que 500 nm, proporcionando pupas de cor marrom. Este resultado é endossado pelo trabalho de Smith (1980) com *P. rapae*, *P. napi* e *P. brassicae* onde comprimentos de onda na faixa do azul favoreceram a produção de pupas marrom e comprimentos de onda próximos ao amarelo favoreceram a coloração verde para as pupas. Em *P. brassicae* o fato de uma cutícula fortemente melanizada induzida por comprimentos de ondas baixo e em altas doses, indica, segundo Kayser & Angersbach (1975), uma adaptação morfológica da cor como um mecanismo de proteção contra radiações prejudiciais.

Smith (1980) concluiu que o período sensitivo para a determinação da cor da pupa ocorre durante o dia, visto que o estímulo luminoso é o principal fator ambiental na determinação desta cor. Ainda Smith, referindo-se às espécies *P. rapae* e *P. napi*, afirma que estas, durante o estágio de pré-pupa, após um estímulo apropriado, liberam um hormônio, denominado pelos autores de "greening factor", o qual torna a futura pupa de cor verde. Kayser (1974) em estudos com *P. brassicae* inferiu que a coloração verde das pupas dependia da liberação de um hormônio redutor de melanização. Ainda com *P. brassicae*, resultados indicam que o hormônio juvenil está envolvido na regulação da pigmentação da pupa e que diferentes condições de luminosidade modificam a liberação deste, ou seja, larvas mantidas sob luz que estimulam uma pigmentação escura liberam mais hormônio juvenil do que aquelas sob condições inibitórias (Ressin, 1980).

A família Papilionidae inclui borboletas de tamanho médio e grande, a maioria das quais possui um prolongamento ("cauda") nas asas posteriores. Por esta característica são mencionadas como "swallowtail butterflies" (borboletas com cauda de andorinha) por pesquisadores que trabalham com espécies desta família. As pupas prendem-se ao local de empupação pelo cremaster e mantêm-se em uma posição quase vertical por meio de um cinto de seda localizado no meio do corpo da pré-pupa.

Estas pupas, assim como os pierídeos, não tem a proteção de um casulo e assim necessitam esconder-se para escapar de predadores visuais. Com este fim, é correto supor que as pupas desta família seguiram dois diferentes caminhos evolutivos, um levando a evolução de pupas monomórficas, as quais se adaptam a um local particular de empupação; e outras desenvolveram polimorfismo na coloração da pupa, o qual permite a utilização de uma variedade de diferentes tipos de local de empupação (Wiklund, 1975). Segundo este autor, a vantagem seletiva do polimorfismo da coloração, determinado pela sobrevivência dos morfos das pupas, depende de três fatores: 1) a estrutura do habitat, 2) a composição das espécies de predadores e 3) a densidade da população de predadores. Evidências encontradas por Sims e Shaphiro (1983b) sugerem que a impalatibilidade existente em algumas larvas poderia estender-se para as pupas aumentando, desta forma, as chances de sobrevivência do indivíduo.

No que se refere à coloração da pupa o grupo dos Papilionídeos possui o maior número de espécies estudadas. A grande maioria das espécies é dimórficas, e há predomínio do dimorfismo verde-marrom (Clarke & Sheppard, 1972; Wiklund, 1972; Hazel, 1977; Smith, 1978; Hazel & West, 1982, 1983; Sims 1983); em *Papilio xuthus* a variação dimórfica fica entre marrom e laranja (Ishizaki & Kato, 1956 - *apud* Hazel, 1977). Já em *P. glaucus* a cor da pupa é exclusivamente marrom (West & Hazel, 1979) sendo, portanto, monomórfica.

De todos os estudos feitos são possíveis duas generalizações: a cor da pupa relaciona-se com a cor do fundo; e este estimula a produção da cor somente durante o período sensitivo pelo qual a larva passa (Clarke & Sheppard, 1972; Wiklund, 1972; Hazel, 1977; Smith, 1978; Hazel & West, 1982, 1983; Sims 1983). Uma explicação alternativa à primeira das generalizações sugere a possibilidade de que a cor da pupa não é influenciada pela cor do sitio de empupação, mas pelo grau de movimento exibido pela larva após ela ter iniciado o período de perambulação (Sevastopulo, 1948). Desta forma o movimento excessivo desencadearia a produção de melanina nas pupas escuras (Sevastopulo, 1973).

Em três espécies estudadas, *Papilio zelicaon* (Sims, 1983), *P. polytes* e *P. demoleus* (Smith, 1978), durante o período sensitivo ocorre a liberação de um hormônio que torna as pupas de cor marrom, sob o devido estímulo. Nas duas últimas espécies a textura do local de empupação tem uma influência maior do que a cor do fundo; assim, uma superfície rugosa promove pupas de cor marrom e superfícies lisas formam pupas verdes. Segundo Smith (1978), espécies que são, principalmente, influenciadas pela textura do local de empupação, como *P. polytes*, atravessam seu período sensitivo à noite, de forma que não poderiam se valer do estímulo ótico. Já *Eurytides marcellus* que utiliza estímulo ótico, tem seu período sensitivo atrasado para que este não ocorra durante a noite (West & Hazel, 1985). Um estudo abordando a sensibilidade dos ocelos larvais em papilionídeos revelou que as larvas possuem três tipos de receptores, sendo eles para ultravioleta, azul e verde, podendo assim terem elas uma visão colorida tricromática (Ichikawa & Tateda, 1980). Outro dado importante é a notificação da presença de luteína e  $\beta$ -caroteno na composição dos pigmentos da cutícula de pupas de coloração verde. Visto que os animais não podem sintetizar estes carotenóides, conclui-se a importância da planta hospedeira neste suprimento (Goodwin, 1952 - *apud* Ohnishi, 1959; Ohnishi, 1959).

Hazel & West (1979) propuseram que um importante fator na determinação para uma espécie desenvolver polimorfismo ou monomorfismo na coloração da pupa, é o tipo de local de empupação utilizado pela espécie. Pupas que são crípticas em folhas secas e utilizam principalmente este local, favoreceriam o desenvolvimento do monomorfismo para pupas de cor marrom. Por outro lado, pupas que se utilizam de uma variedade de locais favoreceriam o desenvolvimento de pupas verde ou marrom, em resposta a cor ou textura do substrato característico. Experimentos mostraram que a sobrevivência de pupas em locais naturais de empupação é maior que se removidas destes locais e colocadas em um ambiente que é utilizado por outra espécie de lepidópteros. Isto está relacionado com a estrutura das espécies de predadores e a forma que estes utilizam para localizar as presas (Wiklund, 1975; West & Hazel, 1982). Estes

últimos autores sugerem que a preferência pelo local de empupação desenvolveu-se sob seleção pelos predadores, e que eles são o primeiro passo na evolução das diferenças no uso da "sugestão" pela textura ou estímulo ótico na determinação da cor da pupa.

Outro fator que também influencia na coloração das pupas é o fotoperíodo em que as larvas se desenvolvem. Fotoperíodos com longo dia (por exemplo 16:8) promovem a formação de pupas de cor verde em algumas espécies de papilionídeos e um fotoperíodo oposto a este, produz pupas de cor marrom (Smith, 1978; Hazel & West, 1983). Temperatura e umidade relativa são mencionados como fatores que influenciam a cor da pupa (Smith, 1978) porém não de forma intensa como os outros fatores citados anteriormente. Porém em uma população de *Battus philenor* da Califórnia (EUA) temperaturas quentes associadas a dias longos aumentam a incidência de pupas marrons (Sims & Shapiro, 1983a). Segundo a visão de Sevastopulo (1948 e 1973) as pupas verdes encontradas em folhas da mesma cor possuem esta coloração por suas larvas terem perambulado por pouco tempo enquanto que pupas de cor marrom originaram-se de larvas que necessitaram deslocar-se para locais mais distantes e por consequência de um maior período de movimento teriam a pupa de cor marrom.

As bases genéticas do dimorfismo na coloração das pupas são consideradas como uma característica com limiar para uma variação genética quantitativa entre dois fenótipos (Hazel, 1977). Esta variação genética faz com que o indivíduo seja mais, ou menos, sensível ao estímulo do meio. A cor marrom é um efeito que ocorre em organismos mais sensíveis, e estes se adaptam a empupar em locais com cores escuras o que lhes confere uma maior proteção (Hazel, 1977; Hazel & West, 1979). Espécies como *Battus philenor* onde a média de indivíduos sensíveis na população é alta, utilizam mais frequentemente "locais marrom" para empupar. Já espécies como *Papilio polyxenes* que possuem a média de fatores sensíveis baixa, preferem utilizar "locais verde" como local de

empupação (Hazel & West, 1979). Em *P. zelicaon*, Sims (1983), encontrou que o dimorfismo é um traço poligênico com efeito de limiar, semelhante ao encontrado por Hazel (1977) em *P. polyxenes* e por Hazel & West (1982) em *Eurytides marcellus*.

A família Nymphalidae é composta por indivíduos que possuem as patas anteriores bastante reduzidas e sem garras; apenas as patas medianas e as posteriores são usadas na locomoção. As pupas ficam usualmente presas e suspensas pelo cremaster. Informações a respeito da coloração da pupa em ninfalídeos abrange poucas espécies nos registros bibliográficos e as referências apresentadas serão somente sobre três espécies.

Pesquisas feitas com a borboleta *Inachis io* abordam principalmente o aspecto fisiológico que promove a coloração da pupa (Maisch & Bückmann, 1987; Bückmann & Maisch, 1987; Starnecker et al, 1994; Starnecker, 1996b, 1997; Starnecker & Bückmann, 1997). Diferentemente dos aspectos referentes a cor da pupa em papilionídeos (verde ou marrom, marrom ou laranja, ou somente marrom para pupas monomórficas), a coloração da pupa de *I. io* varia entre cinco padrões de melanização, onde as categorias foram numeradas de 1 até 5, sendo que o número 1 representa o escore mais baixo na quantidade de melanização e o escore 5 o mais alto grau de melanização (Maisch & Bückmann, 1987). De acordo com os autores citados anteriormente o pigmento que torna a pupa preta é uma melanina e o responsável pelo amarelo é uma luteína.

Durante o período crítico para a diferenciação da pigmentação ocorre a liberação de um fator hormonal em *I. io*, conhecido como "pupal melanization reducing factor" (PMRF) ou "fator redutor de melanização da pupa", o qual distribui-se igualmente por todo o sistema nervoso central da pré-pupa, reduzindo gradualmente a melanização e aumentando a incorporação da luteína, tornando a pupa de cor amarela (Bückmann & Maisch, 1987; Starnecker et al, 1994; Starnecker, 1997). Esta é uma forma alternativa de adaptação ao meio visto que

as larvas de *I. io* preferem ambientes "claros" ao invés de ambientes "escuras" para empupar, sendo deste modo requerida a atividade hormonal que controla a pigmentação e previne a pupa de sofrer a ação dos predadores (Starnecker, 1996b). Este hormônio também é encontrado em lepidópteros que não possuem a coloração da pupa adaptando-se ao meio, o que indica, portanto, que o PMRF ocorra amplamente entre os lepidópteros (Starnecker *et al*, 1997).

O período sensitivo para a determinação da cor da pupa ocorre antes da fase de pré-pupa, aproximadamente de três a quatro horas após a larva de *I. io* começar a tecer a seda que servirá de fixação para o cremaster. Durante a fase de pré-pupa o ambiente não irá mais afetar a coloração da pupa (Maisch & Bückmann, 1987). Porém, experimentos mostraram que o período crítico de liberação do PMRF começa quando se passaram duas horas do início da fase de pré-pupa, isto em ambientes de cor clara, estendendo sua atividade por um período de 14 horas. Um dia após a formação da pupa a coloração e a esclerotização estão completas e a morfologia da cor de adaptação é estabelecida (Starnecker & Bückmann, 1997).

Assim, embora a pigmentação da pupa em resposta a coloração do ambiente é comum entre várias borboletas e tendo um similar período de sensibilidade, seu controle hormonal preciso é variável entre as espécies (Maisch & Bückmann, 1987). Abordagens quanto as bases genéticas da coloração da pupa em *I. io* não foram desenvolvidas por este grupo de pesquisadores e nenhuma referência quanto a este tema foi encontrado na literatura.

A borboleta *Pararge aegeria* é um ninfalídeo da sub-família Satyrinae que habita matas e utiliza gramíneas de locais úmidos como planta hospedeira (Wiklund & Persson, 1983). A coloração da pupa desta borboleta apresenta uma variação dimórfica com pupas de cor verde e marrom, sendo que as primeiras formam-se em ambientes circundantes de cor verde e as últimas em ambientes de cor marrom ou cinza (Van Dyck *et al*, 1998). Um dado importante mencionado por

estes mesmos autores, refere-se a uma relação existente entre a cor da pupa e o tamanho corporal do indivíduo adulto. As borboletas emergidas de pupas de cor verde possuem um tamanho corpóreo maior do que as emergidas de pupas de cor marrom. Para fêmeas, este maior volume implica em uma maior fecundidade; assim, fêmeas emergidas de pupas verdes possuiriam um valor adaptativo maior do que as emergidas de pupas marrom. Segundo explicações dos autores esta diferença pode estar relacionada a um consumo energético necessário para resultar em uma das colorações, ou seja a formação de pupas verdes consome menos energia que a formação de pupas marrons. Para machos a diferença no tamanho corpóreo está relacionada à estratégias ecológicas diferentes. Um dado final a respeito da coloração das pupas nesta espécie indica a formação de pupas verdes numa maior proporção que pupas marrons (65,5% para pupas verdes).

### *O gênero Heliconius*

*Heliconius erato* é uma borboleta de ampla distribuição na Região Neotropical. Uma de suas características marcantes é a ocorrência de inúmeras sub-espécies cujos padrões de coloração variam paralelamente aos da espécie co-mímica *Heliconius melpomene* (Araújo, 1980). As larvas desta espécie utilizam diferentes espécies de passifloráceas, das quais aproveitam substâncias secundárias tóxicas que tornam os adultos relativamente não palatáveis a aves predadoras (Brower et al., 1963; Brower & Brower, 1964) e, também, de alguma forma a predadores invertebrados (Vasconcellos-Neto & Lewinshon, 1984). Outra característica marcante é o fato de apresentarem um comportamento sofisticado em relação a outros lepidópteros, tais como: repouso comunal, com fidelidade ao local; inspeção pela fêmea da planta hospedeira antes de colocar os ovos para evitar predadores e larvas da própria espécie, visto que estas são canibais; as pupas fêmeas de algumas espécies liberam um feromônio que atrai machos, entre outras características (Gilbert, 1975).

*Heliconius erato phyllis* é a sub-espécie do leste do Brasil apresentando um padrão de coloração em preto com manchas vermelhas nas asas anteriores e uma barra amarela nas asas posteriores (figura 1). Abaixo desta barra amarela, é visível no lado ventral pequenos pontos vermelhos denominados "red raylets", os quais variam de 1 até 6, eventualmente alguns indivíduos apresentando 7 (Pansera & Araújo, 1983). As fêmeas desta sub-espécie ao emergir da pupa já estão aptas para copularem, podendo inclusive ocorrer cópula durante a emergência; os machos necessitam de quatro dias em média, após emergirem, para estarem aptos ao cruzamento (Di Mare & Araújo, 1986). O tempo de desenvolvimento de ovo ao indivíduo adulto depende da passiflorácea utilizada pela larva (Menna-Barreto & Araújo, 1985; Périco & Araújo, 1991) mas à temperatura de cerca de 25°C, o tempo médio é de aproximadamente 25 dias. Esta sub-espécie vem sendo alvo de estudos, já a algum tempo, por parte de pesquisadores brasileiros, não só no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mas também no Departamento de Zoologia da mesma universidade bem como no Departamento de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas, SP. Como exemplo pode-se mencionar os trabalhos sobre dinâmica populacional (Saalfeld & Araújo, 1981; Ramos & Freitas, 1999), estrutura genética de populações (Silva & Araújo, 1994), interação borboleta-planta hospedeira (Rodrigues & Moreira, 2002), além de outros, alguns dos quais mencionados em diferentes momentos neste trabalho.

As pupas da borboleta *H. erato phyllis* apresentam uma variação cromática, desde um padrão bem claro, "branco", até um padrão bem escuro, "preto", com diferentes intermediários de coloração. Em relação a este fato e com base na literatura a respeito da coloração de pupas, é possível se fazer de imediato três perguntas: 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?



Para responder a estas perguntas iniciou-se uma série de cruzamentos em insetário, na tentativa de se obter estimativas do grau de herdabilidade desta característica, bem como experimentos para verificar a influência de ambientes variáveis na determinação da cor da pupa. Para isto, estas pupas foram categorizadas em quatro classes de coloração que variam de 2 a 5 (figura 2). Uma tentativa de aperfeiçoar os critérios para os diferentes graus de melanização está em curso, com o uso de um colorímetro, mas os resultados ainda são incipientes.



Figura 1: *Heliconius erato phyllis*, vista dorsal. Detalhes no texto.

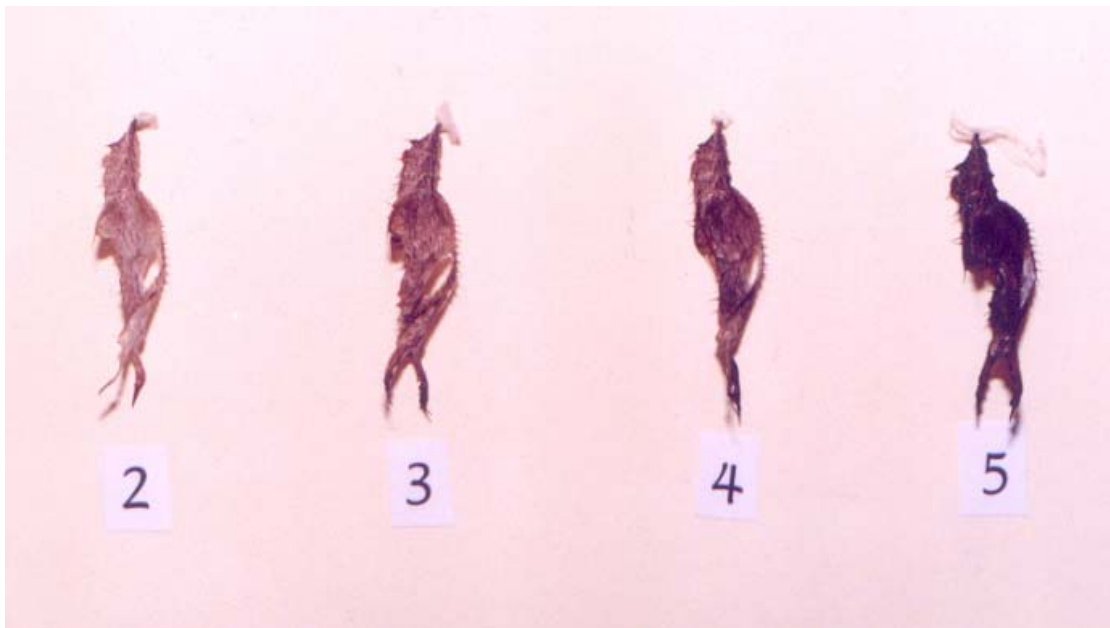


Figura 2: Variação no padrão de coloração das pupas de *Heliconius erato phyllis*. Os números, abaixo de cada exúvia, indicam os escores para o grau de coloração de cada pupa.

## Objetivos

Tendo em vista a revisão bibliográfica apresentada anteriormente, bem como a situação encontrada em *Heliconius erato phyllis*, este projeto de pesquisa desenvolveu-se voltado para os seguintes objetivos:

1. Estimar a herdabilidade da coloração das pupas através de cruzamentos feitos em insetário e criação de larvas em ambientes padronizados.
2. Avaliar o efeito do componente ambiental na determinação da cor da pupa, através de experimentos em laboratório que utilizem diferentes ambientes.
3. Determinar qual o estágio do desenvolvimento pré-adulto que é sensível ao estímulo ambiental.

Como um objetivo a longo prazo, pretende-se ainda estimar a quantidade de locos que segregam para a cor da pupa e testar a associação entre a cor da pupa e alguns componentes do valor adaptativo.

## CAPÍTULO 2

### Resultados

Pupal melanization in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): the contribution of the genotype and of the environment

**PUPAL MELANIZATION IN *Heliconius erato phyllis*  
(LEPIDOPTERA; NYMPHALIDAE): THE CONTRIBUTION OF THE  
GENOTYPE AND OF THE ENVIRONMENT**

Adriano Andrejew Ferreira<sup>1</sup> and Aldo Mellender de Araújo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Fax +55-51-33167311.

<sup>2</sup>Corresponding author. E-mail: [aldomel@portoweb.com.br](mailto:aldomel@portoweb.com.br)

Artigo a ser submetido ao periódico *Heredity*

### Summary

The present paper deals with estimates of heritability and of the effect of two different kinds of environment on the melanization of pupae in the butterfly *Heliconius erato phyllis*. A total of 25 offspring were used in the study, from crosses made in insectary (17) and from females brought from nature (8), already inseminated. Pupal colour followed a system of discrete scores, from 2 for the light pupae to 5 for the darkest one. Four offspring from the crosses were inbred and were discarded in the estimates of heritability. However, they showed a decreasing variance in the scores for pupal colour as the inbreeding coefficient increased, suggesting a genetic background for colour. Estimates of heritability were around 0.30 when the score of the offspring were regressed on the midparental value. When regressed on the male parent,  $h^2$  was larger, varying from 0.40 to 0.73 and was generally negative and very low when female parent was the regressor. Estimates by the analysis of variance resulted in the interval 0.48 - 0.55. To test for the effect of the environment, each offspring were divided in three, one being the control, one subjected to a black environment when reaching the fifth instar and the third to a white one. Those in the dark environment originated pupae that scored 5 or sometimes 4; for those in the white environment, there were no difference with the controls. Caterpillars when entering the prepupal stage were also subjected to the black treatment but did not showed differences with the control treatment, indicating that the critical period for inducing melanization is shortly around the fifth instar.

## 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 and its corresponding survival. 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 and West, 1979). Actually, lepidoptera pupae which are not covered by cocoons or hidden in the ground show an intense integumental coloration (Starnecker, 1996). A large body of data on pupal colour in butterflies have been published, mainly on species of the families Pieridae (Baker, 1970; Angersbach, 1975; Angersbach and Kayser, 1971; Kayser and Angersbach, 1974; Smith, 1980; Ressin, 1980), and Papilionidae (Clarke & Sheppard, 1972; Wiklund, 1972, 1975; Hazel, 1977; Smith, 1978; Hazel and West, 1979, 1982, 1983; West and Hazel, 1982, 1985; Sims 1983). Recently a number of studies of a few species of Nymphalidae have also been published (Maisch and Bückmann, 1987; Bückmann and Maisch, 1987; Starnecker *et al*, 1994; Starnecker, 1996, 1997; Starnecker & Bückmann, 1997; Van Dyck *et al*, 1998). These studies dealt with physiological aspects involved in pupal dimorphism or polymorphism 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*, this subspecies has been the object of study of different groups in Brazil (Silva and Araújo, 1994; Rodrigues and Moreira, 1999; Ramos e Freitas, 1999). The aim 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 the species *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. In this paper we provide estimates of heritability of the colour pattern and a comparison of two treatments corresponding to a white and a black environment.

## Materials and Methods

The butterfly *Heliconius erato phyllis* is a sub-species that lives mainly at Eastern and Southern Brazil. It has a black background colour-pattern with red patches in the forewings and a yellow bar in the hindwing. Below the yellow bar there is a series of red raylets, which can vary from 1 to 7 (Pansera and 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 (sibships inbreeding coefficients of 0.0, 0.125, 0.25, and 0.375). Adults were maintained in insectaries measuring 200 cm X 200 cm X

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  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Larvae were fed daily with *Passiflora suberosa*, *P. misera* and *P. capsularis*. This procedure was taken as the *control* treatment.

To test the effect of environmental alteration, each offspring were partitioned in three: control (already described), darkness and whiteness. In the darkness treatment (*black* treatment) the plastic pots were totally covered with black paper from outside (the white top was covered by black from inside), with caterpillars being transferred to these pots in the beginnings of their 5<sup>th</sup> instar. In the whiteness treatment (*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 (table 5, Results), 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 followed: in the first, which we called *black A*, larvae recently entering the fifth instar were subjected to the black treatment, as previously described. The other variant, *black B*, consisted in introducing larvae in the prepupal stage (when they change the background colour from white to pink) 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 (both authors participate in the scoring). Heritability estimates ( $h^2$ ) were done by using the method of regression and the analysis of variance. The offspring average score for pupal colour was regressed to the midparental value, to the male value, and to the female value. Estimates of the heritability taking each sex separately 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  $\sigma_B^2$  is the between-offspring variance, and  $\sigma_A^2$  is the within-offspring variance. This later value is obtained from the ANOVA table, while  $\sigma_B^2$  is obtained solving the equation

$$MS_{\text{between offspring}} = \frac{N^2 - \sum n_1^2}{N \cdot (k - 1)} \cdot \sigma_B^2 + \sigma_A^2$$

where  $N$  is the total number of observations,  $n_1$  is the number of observations within offspring, and  $k$  is the number of offspring. This method assumes that the non-heritable component of variation between broods is zero.



## Results

### *Genetic Component*

In the whole, 25 offspring were used in this study (table 1). The number of caterpillars in each offspring ranged from 13 to 66, with an average of 33 individuals. Results shown there are all relative to the control treatment; sibs of those caterpillars were used to evaluate the effect of environmental darkening (see Materials and Methods). Four offspring 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 an heritable component in the degree of melanization of the pupa: the variance of the mean offspring scores decreases as the F value increases (0.81, 0.34, and 0.18, respectively for  $F = 0.125$ ,  $0.25$ , and  $0.375$ ; as there were two offspring with  $F = 0.25$ , we took the average variance weighted by offspring size). Their weighted variance mean was equal to 0.40. As for those offspring where the value of the inbreeding coefficient were known to be zero, the weighted variance mean of the scores was 0.47, which although numerically larger is not significantly different from the former value ( $0.10 < p < 0.20$ ).

To estimate the heritable component in the melanization of the pupa the methods of regression and analysis of variance were used (table 2). As expected, estimates of heritability by the analysis of variance are greater than those from the regression. When this method was used, nine estimates of  $h^2$  were obtained, depending on who was used as the regression independent variable (mean of both parents, or each one separately), and who was taken as the dependent variable (mean of the offspring, or each sex separately). When the score of the offspring was regressed on the female parent, all values for heritability were low and negative (fig. 1 A); on the contrary, when regressed on the male parent (fig. 1 B), they were much larger (including one value significantly different from zero). Heritabilities estimates when using the midparental value were generally intermediate between the previous ones (fig. 1 C). Each sex in the offspring seem to be equally affected by the pupal colour of their parents. This can also be seen in table 3, where detailed results of the ANOVA are shown; there is no evidence for sex differences between offspring. However, a highly significant difference was obtained between offspring, and no interaction between offspring and sex. A similar result was obtained for those individuals in the *black* treatment (table 4); what is interesting in this last case is the significant difference between offspring ( $p = 0.029$ ), which indicates that the environmental effect is not enough to discard the genetic effect in pupal colour.

### *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, indicating a strong influence in the melanization of the pupa. However, when transferred to a white environment by the fifth instar, the pupal score did not differ with those under the control treatment. Eight offspring were used in these comparisons and the detailed results are shown in Table 5. As can be seen, all but one (offspring # 15) of the comparisons black x control showed significant differences, while all

comparisons between black x white were significantly different. As for the white x 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 the fifth instar (black A) or in the prepupal stage (black B). The results, shown in table 6, indicate that in the prepupal stage there is no effect of the environmental darkening, since it does not differ with the control treatment. The critical period is then probably shortly around the fifth instar.

## 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 plasticity in pupal colour and its meaning for survival is known since the 19<sup>th</sup> century as referred to by Ford (1975) and Hazel (1995). This later author, in a brief review of the literature, particularly in relation to the Papilionidae, includes three kinds of plasticity, not mutually exclusive, namely *environmentally cued polymorphism* (Sheppard, 1975), *phenotypic modulation* (Smith-Gill, 1983) and *seasonal polyphenism* (Shapiro, 1976). The case of *Heliconius erato phyllis*, here reported, can be viewed as an example of phenotypic modulation, in which the degree of melanization of the pupa is influenced by a dark environment (we did not test for the degree of darkness, instead, one single environment was tested at a time, white x dark, and the controls). In our experiments, scores for pupal melanization varied from 2 (light) until 5 (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 shortly around the beginnings of the fifth instar, while the prepupal stage (used as comparison) is insensitive.

To be able to respond to the environmental stimulus, butterfly larvae should have the appropriate genetic architecture. Under theoretical grounds, a polygenic system could evolve to maintain a conditional strategy, as showed by Hazel, Smock and Johnson (1990). Our results dealing with the genetic component of pupal melanization are compatible with a polygenic control; estimates of heritability by the method of the analysis of variance are close to 0.50. The examination of the frequency distributions of the scores in the different offspring (not shown here) do not indicate any dominance effect. When the regression was used, values of heritability are generally greater than 0.50, particularly when the score of the offspring is regressed on the one of the male parent. That is not the case when the regression is between offspring and the female parent; all the values obtained are negative and very low. We believe that this is not an instance of sex-linked inheritance, as pointed out by Ellers and Boggs (2002) when discussing wing melanization in *Colias*, since the heritabilities for females and males are of the

same order of magnitude in the remaining estimates (table 2). A further independent evidence of a genetic component came from those offspring where the parents were close relatives (inbreeding coefficients varying from 0.125 to 0.375): the mean variance of the pupal scores in those offspring were greater than the mean for the offspring where parents were not related. Taking only inbred offspring, the variance of scores decreased as the inbreeding coefficients increased. Finally, even when fifth instar larvae were subjected to a dark environment, with the resulting pupae being dark, the analysis of variance showed a significant difference among offspring, which suggests genetic differences among the offspring not totally inhibited by the dark treatment.

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

## REFERENCES

- ANGERSBACH, D. 1975. The direction of incident light and its perception in the control of pupal melanization in *Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* 21: 1691-1696.
- ANGERSBACH, D. AND KAYSER H. 1971. Wavelength dependence of light controlled pupal pigmentation. *Naturwissenschaften* 11: 571-572.
- BAKER, R. R. 1970. Bird predation as a selective pressure on the immature stages of the cabbage butterflies, *Pieris rapae* and *P. brassicae*. *J. Zool., London* 152: 43-59.
- BROWN JR. K.S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 427-456.
- BÜCKMANN D. AND A. MAISCH. 1987. Extraction and partial purification of the pupal melanization reducing factor (PMRF) from *Inachis io* (Lepidoptera). *Insect Biochem.* 17: 841-844.
- CLARKE, C. A., AND P. M. SHEPPARD. 1972. Genetic and environmental factors influencing pupal colour in the swallowtail butterflies *Battus philenor* L. and *Papilio polytes* L. *J. Entomol.* 46: 123-133.

- ELLERS, J. AND C. L. BOGGS. 2002. The evolution of wing color in *Colias* butterflies: heritability, Sex linkage, and population divergence. *Evolution* 56: 836-840.
- FORD, E.B. 1975 – *Ecological Genetics*. 4<sup>th</sup> edition .Chapman & Hall. London.
- HAZEL, W. N. 1977. The genetics basis of pupal colour dimorphism and its maintenance by natural selection in *Papilio polyxenes* (Papilionidae: Lepidoptera). *Heredity* 38: 227-236.
- 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, W. N. AND D. A. WEST. 1979. Environmental control of pupal colour in swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Battus philenor* (L.) and *Papilio polyxenes* Fabr. *Ecological Entomology* 4: 393-400.
- HAZEL, W. N. AND 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. AND D. A. WEST. 1983. The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. *Ecological Entomology* 8: 37-42.
- HAZEL, W. N., R. SMOCK, AND M. D. JOHNSON. 1990. A polygenic model for the evolution and maintenance of conditional strategies. *Proceedings of The Royal Society of London B* 242: 181-187.
- JIGGINS, C.D.; NAISBIT, R.E.; COE, R.L. AND MALLETT, J. 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* 411: 302-305.
- KAYSER, H. AND 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. AND 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.
- PANSERA, M. C. G. AND 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. Linnean Soc.* 127: 277-344.
- RAMOS, R.R. AND FREITAS, A.V.L. 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. AND MOREIRA, G.R.P. 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*. 4<sup>th</sup> edition. London: Hutchinson and Co.
- SILVA, L.M. AND ARAÚJO, A. M. 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. 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-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.
- STARNECKER, G. 1997. Hormonal control of lutein incorporation into pupal cuticle of the butterfly *Inachis io* and the pupal melanization reducing factor. *Physiological Entomology* 22: 65-72.
- STARNECKER, G. AND D. BÜCKMANN. 1997. Temporal occurrence of the pupal melanization reducing factor during development of the butterfly, *Inachis io*. *Physiological Entomology* 22: 73-78.
- STARNECKER, G., P. B. KOCH, S. MATSUMOTO, T. MITSUI AND D. BÜCKMANN. 1994. Localization of the pupal melanization reducing factor of *Inachis io* (L.) and comparison with melanization and reddish coloration hormone. *Zeitschrift für Naturforschung* 49c: 476-482.
- 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.
- WEST, D. A. AND W. N. HAZEL. 1982. An experimental test of natural selection for pupation site in swallowtail butterflies. *Evolution* 36: 152-159.
- WEST, D. A. AND W. N. HAZEL. 1985. Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies: timing of the sensitive period and environmental control. *Physiological Entomology* 10: 113-119.
- WIKLUND, C. 1972. Pupal coloration in *Papilio machaon* in response to the wavelength of light. *Naturwissenschaften* 59: 219.
- 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.

Table 1 – Mean score for pupal colour ( $\pm$  standard deviation) in offspring from females caught in nature and from matings in insectary. The scores for pupal colour in the parents, when available, are also shown. F = offspring inbreeding coefficient; n = number of individuals per offspring.

Offspring	n	F	Parent's pupal colour		Offspring's pupal colour
			Male	Female	Mean $\pm$ s.d.
1	43	0*	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*	nature	nature	3.05 $\pm$ 0.52
6	22	0.250	undet.	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.	4	3.86 $\pm$ 0.54
10	19	0*	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*	nature	nature	4.23 $\pm$ 0.81
14	42	0	nature	4	4.14 $\pm$ 0.75
15	13	0*	nature	nature	3.15 $\pm$ 0.38
16	14	0*	nature	nature	3.07 $\pm$ 0.27
17	45	0*	nature	nature	3.71 $\pm$ 0.82
18	42	0*	nature	5	3.90 $\pm$ 0.79
19	46	0*	5	5	3.59 $\pm$ 0.75
20	51	0*	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*	5	5	3.26 $\pm$ 0.59
24	37	0*	5	4	3.86 $\pm$ 0.82
25	30	0*	4	3	4.00 $\pm$ 0.87

0\* - F value unknown, supposed to be zero; undet. - undetermined.

Capítulo 2 Pupal Melanization in *Heliconius erato*  
*phyllis* 27

Table 2: Heritability estimation by the methods of regression and analysis of variance (inbred offspring were not included). Total of offspring used in parenthesis.

Offspring	Regression (Parent x Offspring)			ANOVA
	Midparental value	Male parent	Female parent	
Mean	0.35 ± 0.38 (5)	0.69 ± 0.14 * (5)	- 0.10 ± 0.19 (11)	0.49 ± 0.12 (16)
Males	0.23 ± 0.18 (4)	0.40 ± 0.09 (4)	- 0.01 ± 0.18 (10)	0.48 ± 0.17 (16)
Females	0.30 ± 0.56 (4)	0.73 ± 0.31 (4)	- 0.15 ± 0.22 (10)	0.55 ± 0.19 (16)

\* - Significant at 0.05



Capítulo 2 Pupal Melanization in *Heliconius erato*  
*phyllis* 28

Table 3: Analyses of variance for the 16 offspring used as the *control* treatment (25 ± 1° C – no darkening of the environment).

Source	SS	df	MS	F	p
Sex	0.216	1	0.216	0.302	0.589
Error	12.455	17.437	0.714		
Offspring	85.443	15	5.696	7.714	0.001
Error	11.076	15	0.738		
Interaction (SxO)	11.076	15	0.738	1.466	0.114
Error	238.822	474	0.504		

Capítulo 2 Pupal Melanization in *Heliconius erato*  
*phyllis* 29

Table 4: Analyses of variance for the 5 offspring used as *black* treatment ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  – caterpillar environment totally darkened from the 5<sup>th</sup> instar).

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

Table 5: Analyses by Chi-square between treatments. n = number of individuals.

Offspring	Treatment Comparison								
	Black x Control			White x Control			Black x White		
	$\chi^2$	d.f.	n	$\chi^2$	d.f.	n	$\chi^2$	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 e 0.001.

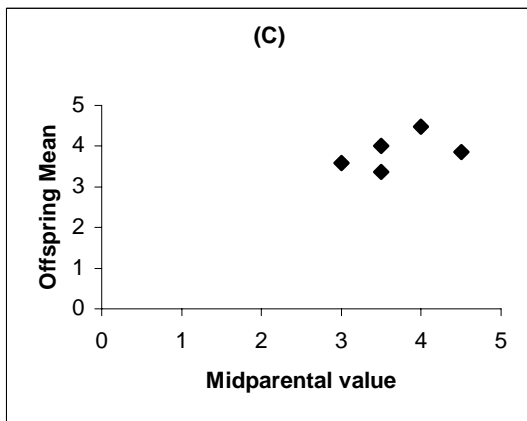
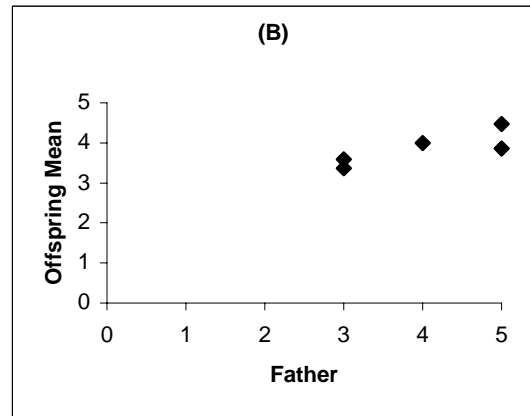
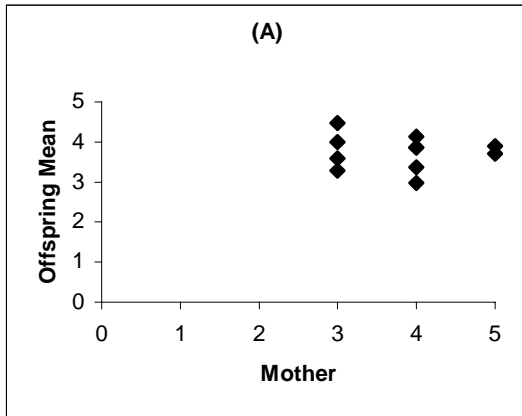
Table 6: Analyses by Chi-square between different *black* treatments and controls (see Materials and Methods for details).

Offspring	Treatment comparison								
	BlackA x Control			BlackB x Control			BlackA x BlackB		
	$\chi^2$	d.f.	n	$\chi^2$	d.f.	n	$\chi^2$	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 e 0.001.

Figure legend

Figure 1: Regression of mean offspring for the degree of pupal melanization on, mother (A), father (B), and midparental value (C) in *Heliconius erato phyllis*.



## CAPÍTULO 3

### Discussão Geral

#### *Componente Ambiental*

##### Influência Ambiental:

A análise dos resultados apresentados na tabela 5 do artigo explicitam a importância da coloração do ambiente na determinação da cor da pupa em *Heliconius erato phyllis*. Indivíduos que empupam inseridos em um “background” escuro produzem preferencialmente pupas de cor escura, sendo os desvios explicados pelo determinante genético desta característica. Isto justifica-se pois a variabilidade fenotípica produzida no ambiente escuro, ou seja, um ambiente homogêneo para todas as larvas, deve-se ao genótipo de cada indivíduo e a interação deste com o meio, sendo estes os fatores limitantes da sensibilidade ao efeito ambiental (Hazel, 1977; Falconer, 1989). A mesma dedução é válida para os fenótipos claros das pupas formadas sob a ação de um “background” branco ou o tratamento controle. Semelhante variabilidade fenotípica obtida a partir de ambientes homogêneos também foi encontrada em *Inachis io* (Starnecker, 1996b).

Os valores sempre mostraram-se altamente significantes quando a comparação envolve o ambiente preto, sendo que as exceções (proles 15 e 16) onde uma das comparações não está na região de significância, mas próxima a ela ( $0,10 > p > 0,05$ ) e as outras três onde  $p < 0,05$ , possuem um fato em comum o qual é o pequeno tamanho amostral (tabela 5). Este, provocado pela morte

precoce da borboleta que ovipositava. Sendo assim é justo desconsiderar este dado não significativo como fato que se contrapõe ao condicionamento da cor pupa por um fator externo, visto que o que ocorre com *H. erato phyllis* não é um caso raro e possui suporte em outras espécies de lepidópteros. Em ninfalídeos, *Pararge aegeria*, em ambientes experimentais, produz uma pupa de cor verde quando rodeada por um microambiente desta cor ou uma pupa de cor marrom quando o ambiente assim lhe proporciona a informação para tanto (Van Dyck et al, 1998). Semelhante influência ambiental também é válida para *Inachis io*, porém com a cor da pupa variando de uma cor clara (amarelo) até um fenótipo escuro (preto) (Maisch & Bückmann, 1987), padrão semelhante ao encontrado em *H. erato phyllis*. O efeito ambiental sobre a coloração da pupa em outras famílias de lepidópteros vem sendo documentado há mais de um século com as observações iniciais de Wood em 1867 (*apud* Baker, 1970) e Merrifield e Poulton, publicadas em 1899 (*apud* Clarke & Sheppard, 1972), sendo seguido por inúmeras publicações abrangendo várias espécies com abordagens ecológicas, evolutivas, genéticas, morfológicas ou fisiológicas.

Outro fator que corrobora uma justificativa da contribuição ambiental na determinação da coloração da pupa em *H. erato phyllis* está inclusa na mesma tabela (tabela 5). A comparação entre o tratamento branco e os indivíduos controle não difere estatisticamente, ou seja, os dois tratamentos exercem a mesma influência sobre larvas no que se refere a futura cor da pupa, reforçando a informação de que estes dois tipos de tratamento reproduzem um ambiente claro. Starnecker (1996b) utilizando vários tratamentos reproduzindo um ambiente claro obteve resposta semelhantes para *I. io*, uma média baixa para os escores da prole. Partindo da produção semelhante destes dois tratamentos, conclui-se que larvas criadas no ambiente branco produzirão, e produzem, pupas diferentes daquelas criadas em ambiente preto, sendo que o resultado encontrado para esta comparação, mostra que estes tratamentos diferem significativamente em todas as proles comparadas, o que endossa os resultados obtidos na comparação entre preto e controle.



#### Período Sensitivo:

Outro ponto de fundamental importância é a determinação do período no qual a larva está suscetível à influência ambiental para a determinação da cor na futura pupa. Os resultados apresentados na tabela 6 do artigo permitem afirmar que este período em *H. erato phyllis* ocorre anteriormente à fase de pré-pupa, pois quando pré-pupas são colocadas em ambiente escuro (tratamento preto B) as pupas resultantes não diferem das formadas em ambiente controle. Já quando larvas em fase de desenvolvimento imediatamente anterior a fase de pré-pupa (quinto ínstar) são colocadas em um ambiente escuro (tratamento preto A) as pupas resultantes diferem daquelas formadas em ambiente controle e do tratamento preto B. Mesmo que o número de proles analisadas não seja grande, a considerável quantidade de indivíduos sob experimento fornecem suporte para esta indicação, visto também que situação semelhante ocorre em *I. io*, onde uma vez o animal tenha se pendurado como pré-pupa, a coloração da futura pupa já esta irreversivelmente determinada (Maisch & Bückmann, 1987). Faz-se necessário agora um refinamento para determinar-se, em horas, quando exatamente tem-se o início deste período crítico para a larva, a partir do início do 5º instar, assim como o tempo de duração deste, visto que em *I. io* o período de maior sensibilidade às informações do meio se prolonga por 3 a 4 horas e ocorre no período em que a larva tece a sua base de fixação para pendurar-se pelo cremaster (Maisch & Bückmann, 1987).

#### Aspectos Fisiológicos:

A produção de um fenótipo escuro ou claro a partir da indicação do meio em *H. erato phyllis* provavelmente deve-se a desencadeamento hormonal como o que ocorre em *I. io* (Maisch & Bückmann, 1987; Bückmann & Maisch, 1987), também um ninfalídeo. A coloração da pupa em lepidópteros controlada neuroendocrinamente foi descrita na família Pieridae para as espécies *Pieris napi* e *P. rapae* onde o hormônio liberado produz a cor verde após estímulo ambiental (Smith, 1980), ou seja, a liberação do hormônio é responsável por um fenótipo

claro, ocorrendo redução na melanização (Kaiser, 1974). Já em Papilionidae, contrariando as duas famílias anteriores, a liberação de um hormônio torna a pupa de cor marrom (Smith, 1978; Sims, 1983; Hazel, 1995). Por ser *H. erato phyllis* um ninfalídeo e a mesma possuir um gradiente de coloração das pupas semelhante a *I. io*, é provável que o sistema neuro-endócrino funcione como o elucidado para esta última espécie, onde o hormônio denominado PMRF (“pupal melanization reducing factor”) reduz a melanização tornando a pupa de cor clara (Bückmann & Maisch, 1987; Starnecker et al, 1994; Starnecker, 1997). O fato deste hormônio, ou molécula semelhante a ele, ocorrer em outras espécies de lepidópteros, com ou sem adaptação pela cor da pupa, (Starnecker, 1996a) é mais um dado que justifica tal hipótese para *H. erato phyllis*. Todavia, para o completo conhecimento dos pontos que desencadeiam a coloração da pupa em *H. erato phyllis* são necessários experimentos que elucidem o controle neuro-endócrino responsável por esta coloração. Tais estudos deverão ser realizados na seqüência deste trabalho; para isso contatos iniciais já foram mantidos com o Dr Gerhard Starnecker, da Universidade de Ulm, Alemanha, visando um período de estágio naquela Universidade.

### *Componente Genético*

Redução da variabilidade:

A evidência do componente genético na determinação da cor da pupa em *H. erato phyllis* se torna clara ao comparar-se as proles apresentadas na tabela 1 do artigo, assim como a análise de resultados embasados nesta. Há clara redução da variância no escore da coloração das pupas (na referida tabela, representada pelo desvio padrão), quando ocorre aumento no coeficiente de endocruzamento (F), ou seja esta redução na variabilidade na coloração das pupas indica aumento de homozigose em cada prole endocruzada. Como exemplo é possível analisar isoladamente as proles de número 2 (macho e fêmea não relacionados biologicamente), 3 e 4 onde os genitores da prole 3 são irmãos e descendem da

prole de número 2. O mesmo ocorre na prole 4 onde seus genitores, já endocruzados, descendem da prole de número 3. Assim temos uma redução ordenada na variância destas proles devido ao aumento do coeficiente de endocruzamento de zero a 0,375. Uma seqüência com valores de F maiores não foi viável devido ao elevado número de mortalidade entre as larvas, fato que já havia sido demonstrado no trabalho de Di Mare e Araújo (1986).

Outro indicativo do componente genético mostra-se através da análise da variância apresentada nas tabelas 3 e 4 onde foram analisados indivíduos criados no tratamento padrão e preto, respectivamente. Esta análise mostra que proles diferentes (foram excluídas as irmandades com  $F > 0$ ) sob o mesmo tipo de tratamento, diferem no que refere-se a coloração das pupas. Partindo do ponto de que cada prole é constituída por irmãos inteiros, visto que as fêmeas desta espécie copulam apenas uma vez durante sua vida, e que cada indivíduo é criado sob igual tratamento de seus outros irmãos, pode-se afirmar que as diferenças encontradas dentro de cada prole são variações genótípicas normalmente esperadas neste tipo de situação, indicação de influência genética. Sustentando esta afirmação, a variância encontrada entre as proles indica que estas diferem significativamente em relação a cor da pupa. A mesma conclusão pode ser extraída dos resultados obtidos com as larvas submetidas ao tratamento preto, pois indivíduos irmãos sob o mesmo tipo de tratamento mostraram uma variância na coloração das pupas quase nove vezes menor do que aquela obtida entre proles diferentes. Em linhas gerais, pela análise da variância utilizando a informação de 613 indivíduos de 16 proles formando 21 agrupamentos, tem-se que estes 21 agrupamentos (16 no tratamento padrão mais 5 no tratamento preto) diferem de forma significativa quando analisados sob o aspecto cor da pupa. É verdade que a comparação entre as médias ponderadas das proles com  $F = 0$  e  $F > 0$  apesar de se mostrarem diferentes numericamente (0,47 para  $F = 0$  e 0,40 para  $F > 0$ ) não o foram estatisticamente.

Evidências de determinantes genéticos na coloração das pupas de lepidópteros foram também demonstradas por Clarke e Sheppard (1972) e Sims (1983) com espécies de Papilionídeos onde a interação genótipo-ambiente está sujeita à seleção. Hazel (1977) e Hazel e West (1982), também com papilionídeos, acrescentam que além da interação genótipo-ambiente na determinação da cor da pupa estar sujeita a seleção esta é um traço com limiar (Falconer, 1989).

Quando as proles são separadas por sexo não é observável diferença na coloração da pupas dentro das proles e entre estas (tabela 1 do apêndice). A análise dentro das proles, sob tratamento padrão, mostra que a média das cores das pupas por sexo somente difere em uma das comparações dentre as 16 proles analisadas. Quando se considera o número total destes indivíduos, 506 (260 fêmeas e 246 machos), para compor uma média ponderada geral para cada sexo os escores encontrados são de 3,64 para as fêmeas e 3,65 para os machos, dado que corrobora aquele encontrado quando as proles são analisadas individualmente. O quadrado médio da análise da variância bifatorial para sexo apresentado nas tabelas 3 e 4 do artigo (tratamento padrão e preto, respectivamente) mostra que a variância dentro de cada sexo é maior que a variância entre os sexos, ou seja, os dados não indicam diferença significativa na coloração das pupas entre sexos diferentes.

Estimativa da herdabilidade pelo método da regressão linear:

A estimativa da herdabilidade da coloração das pupas pelo método da regressão linear exibido na tabela 2 do artigo indica uma estimativa de herdabilidade no sentido restrito. As três primeiras colunas referentes a esta análise mostram conjuntos de valores que além de agrupados pelo próprio delineamento desta análise, agrupam-se também pela coerência dos valores dentro de cada coluna quando comparado com as outras. Esta dado mostra a distinção encontrada quando são levados em conta para a estimativa da herdabilidade a média dos pais em relação a sua prole, os escores maternos em

relação a sua prole e os escores paternos em relação a sua prole. Entre estes distintos valores para cada agrupamento, somente há significância em um dos resultados, os escores paternos em relação a médias das proles (figura 1B, do artigo). Este cálculo indica um valor de 69% para herdabilidade deste caráter quando somente é levado em conta a informação obtida dos pais masculinos em relação a encontrada nos filhos, tanto masculinos quanto femininos. Este dado é representado no diagrama de dispersão na figura 1B do artigo cuja equação da reta é  $y = 2,48 + 0,345x$ . Os outros cálculos utilizando apenas os escores paternos mostraram um nível de significância entre 5 e 10% quando em relação somente aos filhos (masculinos) e  $p > 0,10$  para a relação com as filhas. Contudo, o coeficiente de regressão, utilizado para a estimativa da herdabilidade, apresentou seu maior valor quando a análise envolveu as filhas em relação aos escores paternos, sendo o menor valor a regressão dos filhos em relação aos pais; é importante ressaltar que estes dois valores não foram significantes. A regressão da média da prole em relação aos escores paternos apresentou-se intermediário aos anteriores, mesmo sendo significativa.

Quanto ao cálculo da regressão utilizando os escores maternos em relação as três estimativas para a prole, os valores sempre mostraram-se negativos, ou seja, incompatíveis para a estimativa de herdabilidade, visto que esta não pode ser menor que zero. Estes valores contrastam com os encontrados para os escores paternos onde há um valor significativo de herdabilidade. Não se trata aqui de algo análogo ao que McWhirter (1969) encontrou para machos e fêmeas de *Maniola jurtina* com as fêmeas possuindo maior herdabilidade. Difere também do encontrado por Ellers & Boggs (2002) na borboleta *Colias philodice eriphyle*. Seria relativamente fácil invocar “fatores maternos” para o caso de *H. erato phyllis*, mas a evidência é insuficiente e mais experimentos são necessários.

É interessante comparar os valores da regressão dos escores maternos com aqueles valores da regressão dos escores paternos: quando os filhos (machos) são analisados o valor de  $b$  é maior nos escores maternos do que nos

paternos. Quando as filhas estão sob análise há uma inversão, o valor de  $b$  é maior nos escores paternos do que nos escores maternos. É verdade que tanto num caso como no outro, a herdabilidade não se mostrou significativamente diferente de zero; todavia, o exame dos diagramas de dispersão (figuras, 1A e 1B do artigo) evidencia diferenças que estimulam uma explicação. A comparação que envolve a média da prole está de acordo com o esperado, pois estas são intermediárias entre os valores de filhos e filhas. Ainda quanto à análise onde o escore das mães foi tomado como variável independente, a regressão da média dos filhos sobre os escores maternos é representado pela equação  $y = 3,93 + (-0,049)x$  (figura 1 A, do artigo).

O coeficiente de regressão da média da prole em relação a média dos pais não forneceu uma estimativa da herdabilidade significativa ( $p > 0,10$ ) mesmo que a reta, obtida pela equação  $y = 2,58 + 0,346x$ , tenha sido positiva (figura 1C, do artigo). É importante ressaltar que esta análise leva em consideração todas as informações disponíveis em relação ao caráter em estudo, ou seja, os escores paternos, maternos e a média de cada prole. A falta de significância também foi observável nas duas outras comparações envolvendo a média da filhas e dos filhos separadamente. É importante destacar que estes valores considerando a média dos pais é intermediário àqueles onde considera-se os escores paternos e os escores maternos.

A discussão acima leva a supor que a coloração das pupas pode ser uma característica com um determinante genético influenciado pelo sexo, visto que sempre quando a característica da mãe está envolvida na obtenção do coeficiente de regressão a herdabilidade se mostra negativa. O contrário ocorre no envolvimento dos pais, onde se encontram os valores mais expressivos e um deles significativo estatisticamente. Neste contexto, é adequado citar o trabalho de Johnson e Turner (1980), envolvendo principalmente as espécies *Heliconius erato* e *H. melpomene* onde os mesmos citam que possíveis interações com produtos metabólicos de *qualquer* (grifo dos autores) loco ligado ao sexo poderia

oportunizar uma expressão limitante para um sexo ou outro. O referido trabalho tratou da atividade da enzima 6PGD e sua expressão em machos e em fêmeas. Os autores evidenciaram que para as duas espécies anteriores, não ocorre o fenômeno da compensação de dose, usual em mamíferos para o sexo homogamético. Mesmo que a cor da pupa em *H. erato phyllis* não indique, também, limitação a um dos sexos, é aceitável, para este caso, a influência de interações entre produtos metabólicos. Outro ponto que corrobora esta hipótese é citado neste mesmo trabalho (Johnson e Turner, 1980): o controle genético do polimorfismo, em quase a metade dos casos conhecidos, é feito a partir de um loco ligado aos sexo. Mesmo caracteres ligados fortemente ao sexo, como os estudados por Gula e Taylor Jr. (1980) relacionados ao comportamento reprodutivo de *Colias eurytheme* e *C. philodice* também parecem depender de um “background” autossômico.

Estimativa da herdabilidade pelo método da análise da variância:

A estimativa da herdabilidade pelo método da análise da variância (tabela 2, do artigo) utiliza, neste caso, somente a informação de irmãos inteiros não sendo computados nesta análise os escores dos genitores. Por este fato a herdabilidade calculada é de sentido amplo e confere apenas um limite superior para esta estimativa (Falconer, 1989). Para este cálculo foram utilizadas dezesseis proles sob tratamento controle.

A estimativa da herdabilidade para ambos os sexos através da análise unifatorial forneceu o valor de 0,493, o qual é relativamente maior que seu equivalente encontrado no método da regressão, 0,346. Este é o valor equivalente por levar em consideração a informação média da prole e dos genitores, sendo possível interpretar que informações semelhantes estão disponíveis em cada prole sujeitas ao método da análise da variância. O cálculo da herdabilidade para os indivíduos masculinos de cada prole, 0,481, também mostra-se diferente daquele equivalente encontrado pelo método da regressão, 0,232. A estimativa da

herdabilidade para as fêmeas, 0,548, segue a mesma linha, sendo contrastante com o seu equivalente encontrado pelo método da regressão, 0,296. Para todos estes casos já era esperado um valor mais elevado para a estimativa da herdabilidade através deste método, visto que esta se dá a partir da análise de irmãos inteiros em ambientes semelhantes, o que pode incluir componentes da variância devido à dominância e ao ambiente comum entre irmãos, que assim aumentariam os valores de  $h^2$  (Falconer, 1989). Outro fator inflacionante da estimativa da herdabilidade, por este método, é a utilização da variância genotípica no cálculo. Tal implicação será discutida a seguir.

A comparação através de teste “t” entre as estimativas da herdabilidade de machos e fêmeas não diferiu significativamente de zero. Isto mostra que a herdabilidade para a coloração das pupas é igual em machos e fêmeas pelo método da análise da variância ( $p > 0,10$ ). Porém é importante ressaltar que os dois métodos utilizados para o cálculo além de diferirem em sua metodologia, diferem também nos seus pressupostos. A estimativa da herdabilidade através da análise da variância, a qual não indicou diferença entre os sexos, expressa o quanto dos fenótipos individuais são determinados pelo genótipo (Falconer, 1989), sendo por isso denominada herdabilidade no sentido amplo. Sendo assim esta metodologia utiliza a variância genotípica sem desmembrá-la. É importante lembrar que dentro desta estão inclusas as variâncias de aditividade, dominância e interação. A estimativa da herdabilidade pelo método da regressão leva em consideração o escore dos pais em relação a uma média da prole, ou seja, analisa se há regressão da média dos escores dos filhos sobre os escores dos genitores e a partir desta informação extrai a estimativa da herdabilidade, a qual é de sentido restrito, como mencionado anteriormente. Desta forma o valor indica o quanto do fenótipo é expresso pelos genes herdados dos genitores (Falconer, 1989). A herdabilidade de sentido restrito se utiliza somente da variância aditiva, dentre as variâncias que compõem a variância genética, visto que esta é a única que é transmitida dos genitores para a sua prole num sistema poligênico (Beiguelman, 1994). Assim a desconsideração da variância de dominância, a qual neste caso



deve ser nula, ou de valor extremamente baixo, e da variância de interação que deve representar um valor expressivo devido ao forte componente ambiental, a herdabilidade pelo método da regressão possui um valor menor do que a outra já citada.

Um passo importante para o completo conhecimento genético da coloração das pupas em *H. erato phyllis* reside na identificação do complexo poligênico envolvido. Porém a identificação dos locos com traço quantitativos (“quantitative trait loci” ou QTL) não é uma tarefa fácil e pode tornar-se mais complexa devido a baixa herdabilidade do caráter. Os passos sugeridos para a identificação de um QTL são: 1) ligação e associação; 2) mapeamento fino; 3) análise da seqüência e 4) testes funcionais com os genes candidatos (Glazier et al, 2002). Os mesmos autores também propõe que o estudo de genes modificadores são um meio efetivo de simplificar a análise dos QTLs. Além das propostas anteriores, em *H. erato phyllis* são necessários cruzamentos direcionados com o fim de obter-se duas linhagens extremas e homogêneas em relação a cor das pupas, as quais seriam cruzadas para a obtenção de uma distribuição fenotípica ampla, facilitando assim a análise molecular.

### *Plasticidade Fenotípica e Adaptação*

West-Eberhard (1989) define plasticidade fenotípica como sendo a habilidade de um único genótipo em produzir mais do que uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico, e/ou comportamento em resposta às condições ambientais. A plasticidade fenotípica na coloração das pupas já foi mostrada em vários trabalhos, porém sem ser pronunciada na grande maioria destes. Porém, a abordagem direta do tema é rara (Hazel, 1995; Hazel et al, 1987; Hazel et al, 1990; Starnecker & Hazel, 1999). Talvez os poucos trabalhos como os citados devem-se ao fato da plasticidade fenotípica ter sido negligenciada por um determinado período (West-Eberhard, 1989). Mas, mesmo que este tema não

tenha uma grande quantidade de trabalhos, não faltam suportes para inserir o caráter de *H. erato phyllis* neste sistema.

A coloração da pupa em *H. erato phyllis* adapta-se a este conceito, visto que esta característica possui um determinante genético, mesmo com um baixo valor de herdabilidade. Esta base genotípica permite plasticidade em relação a cor devido a influências externas. A situação seria melhor traduzida ao considerar-se que a coloração da pupa é o resultado final de um processo que inicia-se devido ao “background” genético do indivíduo. Assim considerando, a plasticidade não ocorreria somente a nível morfológico, mas também a nível fisiológico, como, por exemplo, em *Pieris brassicae*, onde o fato de liberar ou não o hormônio redutor de melanização de pupa (Kaiser, 1974) são dois estados que dependem do meio externo e do genótipo. Este hormônio foi denominado de “greening factor” por Smith (1980).

Na espécie *H. erato phyllis* o genótipo de cada indivíduo deve impor limites para a atuação do ambiente. Sendo assim cada genótipo possuiria uma variação de fenótipos limitada, ou seja, uma norma de reação (Hazel et al, 1990), sendo que esta interação genótipo x ambiente dar-se-ia através do sistema neuro-endócrino. Em algumas espécies de papilionídeos a variação polimórfica verde-marrom é herdada como um traço com limiar (Hazel, 1977; Hazel & West, 1982; Sims, 1983; Falconer, 1989) onde a produção de uma pupa verde ou marrom depende da sensibilidade do indivíduo, bem como da intensidade do estímulo ambiental indutor (Hazel, 1977, 1995), o que pode ser traduzido como a relação do sistema neuro-endócrino com o genótipo. A cor da pupa em *H. erato phyllis* não se adapta a um caráter polimórfico com limiar, visto que os fenótipos são contínuos, indicando plasticidade contínua (figura 2 da Introdução Geral, onde os quatro fenótipos constituem uma conveniência para análise), porém é totalmente aceitável que o fenótipo dependa da sensibilidade do indivíduo e da intensidade do estímulo ambiental. Para *Inachis io* não foram executados experimentos genéticos, mas os resultados fisiológicos e ecológicos (Maisch & Bückmann, 1987;

Bückmann & Maisch, 1987; Starnecker, 1996b) indicam a interação proposta acima. As diferenças entre papilionídeos e ninfalídeos provavelmente deve-se a evolução independente da plasticidade fenotípica entre estas duas famílias (Starnecker & Hazel, 1999).

As características morfológicas da pupa de *H. erato phyllis* indicam que esta possui a capacidade de camuflar-se, visto que sua forma peculiar lembra uma folha seca, principalmente quando a coloração é clara. Observações piloto em insetário mostraram que o fenótipo escuro normalmente estava inserido em um “background” escuro. Estes testes deram-se com as larvas criadas livremente sobre a planta hospedeira. Desta forma permitia-se que elas “escolhessem” o local de empupação. O controle diário permitia a localização da pupa no insetário. Em *P. polyxenes* a plasticidade fenotípica em pupas escuras é adaptativa pois permite que esta torne-se críptica sobre sítios de empupação marrom fornecendo a elas uma maior chance de escapar aos predadores do que pupas não crípticas (Hazel et al, 1987). Outro caso de plasticidade fenotípica, porém ligado a polimorfismo, ocorre nas larvas de *Nemoria arizonaria*, um geometrídeo. Larvas que eclodem sobre as flores estaminadas do carvalho mimetizam estas, enquanto que as eclodidas sobre os ramos mimetizam estes. O mimetismo seria acionado pelas diferentes dietas (Greene, 1989).

Sendo a coloração da pupa em *H. erato phyllis* um caráter plástico, este provavelmente confere adaptação ao meio, como justificado acima, e conseqüentemente está sujeito a seleção natural. Outro fator que endossa que a cor da pupa é uma característica ligada ao valor adaptativo da espécie é o fato desta possuir um baixo valor de herdabilidade. Pois, segundo Falconer (1989) caracteres proximalmente ligados ao “fitness” possuem herdabilidade baixa sendo importantes para a seleção natural.

Partindo do ponto que a coloração da pupa em *H. erato phyllis* é um sistema baseado em poligenes, supõem-se que a interação entre as dicas

ambientais, hormônios e as conseqüências fenotípicas são freqüentemente instáveis, como indicado por Moran (1992); assim os sistemas de troca podem ajustar-se a variabilidade ambiental e a seleção favoreceria sempre a melhor combinação fenótipo-ambiente. Desta forma, uma possível escolha do local de empupação por *H. erato phyllis* seria extremamente vantajosa (o que parece ocorrer em *Inachis io* - Starnecker, 1996b). A existência deste comportamento implicaria em vantagens seletivas para os indivíduos que melhor o fizessem, pois no caso da existência de predadores o animal melhor camuflado teria maiores chances de sobrevivência. Desta forma a interação genótipo-ambiente ajuda a vencer as limitações levando a um novo avanço evolutivo e diversificação (Stebbins & Hartl, 1988). Porém as raras pupas encontradas na natureza e as localizadas em insetário variavam em alturas de poucos centímetros até 2 metros. Assim, o pouco conhecimento dos sítios de empupação de *H. erato phyllis* somente permite especulações sobre os tipos de predadores, os quais podem ser aves e pequenos mamíferos, não permitindo maiores inferências sobre vantagens adaptativas ligas ao sítio de empupação. Para uma resposta adequada à estas questões estudos controlados em campo são necessários.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho procurou-se analisar a coloração das pupas em *Heliconius erato phyllis* em relação aos componentes genético e ambiental. Um total de 25 proles foi utilizado neste estudo, sendo 17 a partir de cruzamentos feitos em insetário e 8 provenientes de fêmeas já fecundadas trazidas da natureza. A coloração das pupas seguiu um sistema de escores discretos sendo a cor mais clara categorizada como 2 e a mais escura como 5.

Para testar o efeito ambiental (na realidade, apenas *um* componente ambiental, particularmente a sensibilidade da lagarta à um ambiente claro ou à um ambiente escuro), cada prole foi dividida em três tratamentos: controle, preto, e branco, com as lagartas sendo transferidas para estes tratamentos no início do 5º instar. O tratamento controle consistia na criação das larvas em potes translúcidos, com o fundo coberto por papel de cor bege e à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação permanente. Os dois outros tratamentos diferiam do anterior por terem todo o revestimento interno dos potes, ora com papel branco, ora com papel preto; nos demais itens, os tratamentos eram idênticos. As lagartas, individualizadas, eram alimentadas diariamente. As pupas desenvolvidas no tratamento preto obtiveram escore 5 ou 4 e as desenvolvidas no tratamento branco não diferiram estatisticamente daquelas do controle. Este caso pode ser visto com um exemplo de modulação fenotípica na qual o grau de melanização da pupa é influenciado por um ambiente preto.

Para obter-se maiores informações em relação ao tempo de sensibilidade das lagartas ao ambiente preto, elas foram testadas em diferentes tempos de desenvolvimento. Quando elas foram submetidas ao tratamento preto na fase de pré-pupa, estas não mostraram diferenças em relação ao tratamento controle, mas

sim quando colocadas sob este tratamento no instar anterior, indicando que o período crítico na indução da melanização ocorre de forma breve no 5º instar.

O componente genético foi estudado através dos cruzamentos onde levou-se em conta o grau de parentesco (coeficientes de endocruzamento de irmãos inteiros de 0,0; 0,125; 0,25 e 0,375) e a estimativa da herdabilidade ( $h^2$ ) pelos métodos da regressão e da análise da variância. Quatro proles dos cruzamentos foram endocruzadas e assim descartadas das estimativas de herdabilidade. Todavia, elas mostraram uma variância decrescente nos escores das colorações das pupas quando o coeficiente de endocruzamento aumentava, sugerindo uma base genética para a coloração.

As estimativas da herdabilidade situaram-se ao redor de 0,30 na regressão da média dos escores da prole sobre a média dos genitores. A regressão da média da prole sobre o escore dos pais (masculinos) forneceu valores de  $h^2$  maiores, variando de 0.40 a 0.73. Esta foi negativa e extremamente baixa quando os escores maternos estavam envolvidos. As estimativas pela análise da variância resultaram em um intervalo de 0.48 a 0.55.

Um resultado adicional que reforça a idéia de um componente genético, foi obtido a partir do tratamento preto: mesmo quando larvas de 5º instar foram sujeitas ao ambiente preto, com as pupas resultantes sendo escuras, a análise da variância mostrou diferenças significantes entre as proles, o que sugere uma diferença genética entre estas. Assim, mesmo havendo uma forte influência do ambiente preto na indução de pupas pretas, a resposta das proles mostrou variação que deve ser devida à diferenças genéticas.

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que o componente genético na melanização da pupa é compatível com o modelo de controle poligênico.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

This work analysed the genetic and the environmental influence on the pupal colouration in the butterfly *Heliconius erato phyllis*. A total of 25 offspring were used in the study, 17 from crosses made in insectary, and 8 from females brought from nature, already inseminated. Pupal colour followed a system of discrete scores, from 2 for the light pupae to 5 for the darkest ones.

To test the effect of environmental alteration (actually only *one* environmental component, namely the caterpillar sensitivity to a light or to a dark environment), each offspring was subjected to three treatments: control, darkness and whiteness, with caterpillars being transferred to these treatments in the beginnings of their 5<sup>th</sup> instar. The control treatment consisted in rearing caterpillars in translucent pots, with the bottom covered with beige paper and at a temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and with permanent illumination. The two other treatments differed from the previous one by having their pots covered internally with white or with black paper; the remaining procedures being similar. Caterpillars, growing individually, received daily abundant food. Pupae from the dark environment originated pupae that scored 5 or sometimes 4; for those in the white environment, there were no differences with the controls. The case can be viewed as an example of phenotypic modulation, in which the degree of melanization of the pupa is influenced by a dark environment.

To get more details on the time the caterpillars were sensible to the darkening of environment, they were tested at different age of development. When they were subjected to the dark treatment at the prepupal stage, the score for the pupae did not differ statistically from those of the control treatment. However, when subjected to the dark environment at the 5<sup>th</sup> instar, the resulting pupae had scores

statistically different from the control treatment. This indicates that the critical period for inducing melanization is shortly around the 5<sup>th</sup> instar.

The genetic component was studied through crosses where the degree of relatedness were taken into account (inbreeding coefficients of the sibship being 0.0 for the unrelated, and 0.125, 0.25, and 0.375). Heritability estimates ( $h^2$ ) were done by the methods of regression and analysis of variance. Four offspring from the crosses were inbred and were discarded in the estimates of heritability. However, they showed a decreasing variance in the scores for pupal colour as the inbreeding coefficient increased, suggesting a genetic background for colour.

Estimates of heritability were around 0.30 when the score of the offspring were regressed on the midparental value. When regressed on the male parent,  $h^2$  was larger, varying from 0.40 to 0.73 and was generally negative and very low when female parent was the regressor. Estimates by the analysis of variance resulted in the interval 0.48 - 0.55.

One additional fact comes from the black treatment. Even when fifth instar larvae were subjected to a dark environment, with the resulting pupae being dark, the analysis of variance showed a significant difference among offspring, which suggests genetic differences among the offspring not totally inhibited by the dark treatment.

Our results dealing with the genetic component of pupal melanization are compatible with a polygenic control.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angersbach, D. 1975. The direction of incident light and its perception in the control of pupal melanization in *Pieris brassicae*. **Journal of Insect Physiology** 21: 1691-1696.
- Angersbach, D. and H. Kayser. 1971. Wavelength dependence of light controlled pupal pigmentation. **Naturwissenschaften** 11: 571-572.
- Araújo, A. M. 1980. Estudos genéticos e ecológicos em *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Actas IV Congresso Latinoamericano de Genética** 2: 199-206.
- Baker, R. R. 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.
- Beiguelman, B. 1994. A interpretação genética da variabilidade humana. Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações. pp: 23-73. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo.
- Brower, L. P., J. V. Z. Brower and C. T. Collins. 1963. Experimental studies of mimicry. 7. Relative palatability and mullerian mimicry among neotropical butterflies of the sub-family Heliconiinae. **Zoologica** 48: 65-84.
- Brower, L. P. and J. V. Z. Brower. 1964. Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological chemistry. **Zoologica** 49: 137-158.
- Bückmann D. and A. Maisch. 1987. Extraction and partial purification of the pupal melanization reducing factor (PMRF) from *Inachis io* (Lepidoptera). **Insect Biochemistry** 17: 841-844.
- Clarke, C. A., and P. M. Sheppard. 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.

- Di Mare, R. A. and A. M. Araújo. 1986. A first survey of inbreeding effects in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Revista Brasileira de Genética IX** 1: 11-20.
- Ellers, J. and 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 3<sup>rd</sup> ed. Longman Scientific & Technical. London.
- Gilbert, L. E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. Em L. E. Gilbert e P. H. Raven (eds.), *Coevolution of Animals and Plants*. Univ. Texas Press, 210-240.
- Glazier, A. M.; J. H. Nadeau and T. J. Aitman. 2002. Finding genes that underlie complex traits. **Science** 298: 2345-2349.
- Goodwin, T. W. 1952. The comparative biochemistry of carotenoids. Chapman and Hall, London.
- Greene, E. 1989. A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar. **Science** 243: 643-646.
- Gruha, J. W. and O. R. Taylor, Jr. 1980. The effect of X-chromosome inheritance on mate-selection behaviour in the sulfur butterflies, *Colias eurytheme* and *C. philodice*. **Evolution** 34: 688-695.
- Hazel, W. N. 1977. The genetics basis of pupal colour dimorphism and its maintenance by natural selection in *Papilio polyxenes* (Papilionidae: Lepidoptera). **Heredity** 38: 227-236.
- 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, W. N. and D. A. West. 1979. Environmental control of pupal colour in swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Battus philenor* (L.) and *Papilio polyxenes* Fabr. **Ecological Entomology** 4: 393-400.

- Hazel, W. N. and 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. and D. A. West. 1983. The effect of larval photoperiod on pupal colour and diapause in swallowtail butterflies. **Ecological Entomology** 8: 37-42.
- Hazel, W. N.; R. Brandt and T. Grantham. 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. N., R. Smock, and M. D. Johnson. 1990. A polygenic model for the evolution and maintenance of conditional strategies. **Proceedings of The Royal Society of London B** 242: 181-187.
- Hidaka, T., T. Kimura and M. Onosaka. 1959. Experiments on the protective coloration of pupae of the swallowtail, *Papilio xuthus* L. **Dobutsukaku zasshi** 68: 222-226.
- Ichikawa, T. and H. Tateda. 1980. Cellular patterns and spectral sensitivity of larval ocelli in the swallowtail butterfly *Papilio*. **Journal of Comparative Physiology A** 139: 41-47.
- Ishizaki, H. and M. Kato. 1956. Environmental factors affecting the formation of orange pupae *Papilio xuthus*. **Memoirs, College of Science, University of Kyoto B** 23: 11-19.
- Johnson, M. S. and J. R. G. Turner. 1980. Absence of dosage compensation for a sex-linked enzyme in butterflies (*Heliconius*). **Heredity** 43: 71-77.
- Kayser, H. 1974. Die rolle der carotinoide und des gallenfarbstoffs bei der farbmodifikation der puppen von *Pieris brassicae*. **Journal of Insect Physiology** 20: 89-103.
- Kayser, H. and D. Angersbach. 1974. Action spectra for light-controlled pupal pigmentation in *Pieris brassicae*: Melanization and level of bile pigment. **Journal of Insect Physiology** 20: 2277-2285.

- Kayser, H. and D. Angersbach. 1975. Dose effects in light-controlled pupal melanization in *Pieris brassicae*: specificities to spectral ranges. **Journal of Insect Physiology** 21: 589-594.
- Maynard Smith, J. 1982. Evolution and the theory of games. **Cambridge University Press**.
- Maisch A. and D. Bückmann. 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.
- McWhirter, K. 1969. Heritability of spot-number in scillonian strains of the meadow brown butterfly (*Maniola jurtina*). **Heredity** 24: 314-318.
- Menna-Barreto, Y. and A. M. Araújo. 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). **Journal of Research on the Lepidoptera** 24: 41-46.
- Merrifield, F. and E. B. Poulton, 1899. The colour-relation between de pupae of *Papilio machaon*, *Pieris napi* and many others species, and the surroundings of the larvae preparing to pupate, etc. **Transactions of the Entomological Society of London** 1899: 369-433.
- Moran, N. A. 1992. The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. **The American Naturalist** 139: 971-989.
- Ohnishi, E. 1959. Pigment composition in the pupal cuticles of two colour types of the swallowtails, *Papilio xuthus* L. and *P. protenor demetrius* Cramer. **Journal of Insect Physiology** 3: 132-145.
- Pansera, M. C. G. and A. M Araújo. 1983. Distribution and heritability of the red raylets in *Heliconius erato phyllis* (Lepid.; Nymph.). **Heredity** 51: 643-652.
- Périco, E. and A. M. Araújo. 1991. Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Evolución Biológica** 5: 59-74.
- Ramos, R. R. And A. V. L. Freitas. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Journal of The Lepidopterists' Society** 53: 11-21.

- Ressin, W. J. 1980. The effect of juvenile hormone on pupal pigmentation of *Pieris brassicae* L. **Journal of Insect Physiology** 26: 295-302.
- Rodrigues, D. and G. R. P. Moreira. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. **Brazilian Journal of Biology** 62: 321-332.
- Saalfeld, K. and A. M. Araújo. 1981. Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). I: Demography of a natural population. **Revista Brasileira de Biologia** 41: 855-860.
- Sevastopulo, D. G. 1948. The colour relationship between certain pupae and their surroundings. **Proceedings of The Royal Entomological Society of London A** 23: 10-12.
- Sevastopulo, D. G. 1973. An alternative cause of dimorphism in *Papilio* pupae (Papilionidae). **Journal of The Lepidopterists' Society** 27: 155-156.
- Silva, L. M. And A. M. Araújo. 1994. The genetic structure of *Heliconius erato* populations. **Revista Brasileira de Genética** 17: 19-24.
- Sims, S. R. 1983. The genetic and environmental basis of pupal colour dimorphism in *Papilio zelicaon* (Lepidoptera: Papilionidae). **Heredity** 50: 159-168.
- Sims, S. R. and A. M. Shapiro. 1983a. Pupal colour dimorphism in california *Battus philenor*: pupation sites, environmental control, and diapause linkage. **Ecological Entomology** 8: 95-104.
- Sims, S. R. and A. M. Shapiro. 1983b. 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.
- Starnecker, G. 1996a. Occurrence of a pupal melanization reducing factor in different insects. **Zeitschrift für Naturforschung** 51c: 759-762.

- Starnecker, G. 1996b. Colour preference for pupation sites of the butterfly larvae *Inachis io* and the significance of the pupal melanization reducing factors. **Naturwissenschaften** 83: 474-476.
- Starnecker, G. 1997. Hormonal control of lutein incorporation into pupal cuticle of the butterfly *Inachis io* and the pupal melanization reducing factor. **Physiological Entomology** 22: 65-72.
- Starnecker, G., P. B. Koch, S. Matsumoto, T. Mitsui and D. Bückmann. 1994. Localization of the pupal melanization reducing factor of *Inachis io* (L.) and comparison with melanization and reddish coloration hormone. **Zeitschrift für Naturforschung** 49c: 476-482.
- Starnecker, G. and D. Bückmann. 1997. Temporal occurrence of the pupal melanization reducing factor during development of the butterfly, *Inachis io*. **Physiological Entomology** 22: 73-78.
- Starnecker, G.; P. B. Koch; S. Matsumoto; K. Endo and O. Yamashita, 1997. Occurrence of four neuropeptides in the anterior central nervous system of the butterfly *Precis coenia*. **Naturwissenschaften** 84: 152-154.
- Starnecker, G. and W. Hazel. 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.
- Stebbins, G. L. and D. L. Hartl. 1988. Comparative evolution: latent potentials for anagenetic advance. **Proceedings of National Academic Science** 85: 5141-5145.
- 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.
- Vasconcellos-Neto, J. and T. M. Lewinsohn. 1984. Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. **Ecological Entomology** 9: 337-344.
- West, D. A. and W. N. Hazel. 1979. Natural pupation sites of swallowtail butterflies (Lepidoptera: Papilioninae): *Papilio polyxenes* Fabr., *P. glaucus* L. and *Battus philenor* (L.). **Ecological Entomology** 4: 387-392.

- West, D. A. and W. N. Hazel. 1982. An experimental test of natural selection for pupation site in swallowtail butterflies. **Evolution** 36: 152-159.
- West, D. A. and W. N. Hazel. 1985. Pupal colour dimorphism in swallowtail butterflies: timing of the sensitive period and environmental control. **Physiological Entomology** 10: 113-119.
- West-Eberhard, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics** 20: 249-278.
- Wiklund, C. 1972. Pupal coloration in *Papilio machaon* in response to the wavelength of light. **Naturwissenschaften** 59: 219.
- Wiklund, C. 1975. Pupal colour polymorphism in *Papilio machaon* L. and the survival in the field of cryptic and non-cryptic pupae. **Transactions of The Royal Entomological Society of London** 127: 73-84.
- Wiklund, C. and A. Persson. 1983. Fecundity, and the relation of egg weight variation to offspring fitness in the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*, or why don't butterfly females lay more eggs? **Oikos** 40: 53-63.
- Wood, T. W. 1867. Remarks on the colouration of chrysalids. **Proceedings of the Entomological Society of London** 1867: xcix.

## APÊNDICE

Tabela 1: Coloração das pupas dos genitores e média da coloração das pupas da prole separadas por sexo. Apenas proles com  $F = 0$  e  $n > 6$  por sexo.

Prole	Coloração das pupas dos pais		F	Coloração das pupas da prole			
	Macho	Fêmea		Macho		Fêmea	
				média $\pm$ d.p.	n	média $\pm$ d.p.	n
5	natureza	natureza	0*	2,95 $\pm$ 0,51	20	3,13 $\pm$ 0,54	24
7	natureza	4	0	2,94 $\pm$ 0,66	17	3,00 $\pm$ 0,60	12
8	natureza	3	0	3,26 $\pm$ 0,66	35	3,27 $\pm$ 0,69	30
9	n.d	4	0	3,76 $\pm$ 0,54	21	4,00 $\pm$ 0,50	17
11	5	3	0	4,19 $\pm$ 0,81	21	4,79 $\pm$ 0,54	19
13	natureza	natureza	0*	4,30 $\pm$ 0,82	10	3,86 $\pm$ 0,90	7
14	natureza	4	0	4,30 $\pm$ 0,82	10	3,82 $\pm$ 0,75	11
17	natureza	natureza	0*	3,29 $\pm$ 0,49	7	3,67 $\pm$ 0,72	15
18	natureza	5	0*	3,50 $\pm$ 0,54	8	3,85 $\pm$ 0,80	13
19	5	5	0*	3,91 $\pm$ 0,83	11	3,46 $\pm$ 0,52	11
20	natureza	natureza	0*	3,88 $\pm$ 0,93	17	3,64 $\pm$ 0,75	14
21	natureza	5	0	3,76 $\pm$ 0,75	17	3,63 $\pm$ 0,81	16
22	3	3	0	3,67 $\pm$ 0,78	12	3,53 $\pm$ 0,72	17
23	5	5	0*	3,50 $\pm$ 0,53	10	3,12 $\pm$ 0,60	17
24	5	4	0*	4,00 $\pm$ 0,82	16	3,76 $\pm$ 0,83	21
25	4	3	0*	4,00 $\pm$ 0,88	14	4,00 $\pm$ 0,89	16

0\* - F valor desconhecido, mas supõe-se que seja zero;

n.d.- não determinado.



Figura 1: Gráficos de distribuição fenotípica por prole. Incluído somente indivíduos criados no tratamento padrão:

