

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

A evolução dos comportamentos canibal e não-canibal em imaturos de *Heliconius erato phyllis* e evidências da herança do reconhecimento de parentesco lagarta-ovo

Janaína De Nardin

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, março de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no setor de Genética Vegetal da mesma Universidade (uso de balanças), com o fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Aldo Mellender de Araújo pela orientação, disponibilidade, incentivo e amizade.

Aos colegas de laboratório: Ana Carolina Aymone, Ana Carolina da Silva, André Klein, Bruna Missaggia, Camila Horbach, Heitor Fernandes, Luciana da Silva, Marcelo Costa, Mariana Giozza, Pedro Brum e Rosana Huff, pela ajuda na criação das lagartas e borboletas, auxílio em campo, e pelos inúmeros momentos de descontração e amizade. E à Bruna agradeço também pela contribuição no segundo artigo dessa dissertação, na realização dos experimentos de canibalismo entre lagartas de instares diferentes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Elmo Cardoso pela disponibilidade e serviço prestado a todos do departamento.

À Sílvia Richter, Luciane Passaglia e a todo o grupo de Genética Vegetal pelo frequente empréstimo da balança analítica (afinal, foram mais de 1700 ovos pesados, sem contar as pupas...).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Zenei e Gilberto, e ao meu irmão Rodrigo, pelo apoio, carinho e força. Além disso, pelas contribuições dadas ao laboratório de Genética Ecológica. E um agradecimento especial ao meu irmão por toda a ajuda durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract.....	9
Capítulo 1.....	12
Introdução Geral.....	12
Objetivos.....	24
Capítulo 2.....	25
Costs and benefits of cannibalistic and non-cannibalistic caterpillars and their correlates with kin selection in a butterfly.....	25
Abstract.....	27
Lay Summary.....	28
Introduction.....	29
Material and Methods.....	32
Results.....	38
Discussion.....	43
Acknowledgments.....	47
References.....	47
Capítulo 3.....	54
Uma abordagem experimental para testar a fonte da informação sobre o parentesco em imaturos de uma borboleta.....	54
Resumo.....	56
Introdução.....	57
Métodos.....	59
Resultados.....	64

Discussão.....	66
Agradecimentos	71
Referências	71
Capítulo 4.....	77
Genes para canibalismo ou para reconhecimento de parentesco?	
Estudos adicionais dos efeitos do endocruzamento em <i>Heliconius erato phyllis</i>	
(Lepidoptera; Nymphalidae).....	77
Resumo.....	79
Introdução	80
Material e Métodos.....	83
Resultados	86
Discussão.....	89
Agradecimentos	94
Referências	94
Capítulo 5.....	99
Discussão Geral	99
Referências Bibliográficas	106

RESUMO

O reconhecimento de parentes é importante para a evolução de comportamentos como o altruísmo e a cooperação. As lagartas recém-eclodidas de *Heliconius erato phyllis* podem ser canibais e reconhecer ovos irmãos, canibalizando preferencialmente não-parentes quando há a opção de canibalizar um ou outro. A presente Dissertação compreende três artigos relacionados, especificados a seguir. O primeiro enfoque foi buscar responder se o reconhecimento de parentesco observado nessa espécie (demonstrado em artigo publicado em 2011 pela autora) é compatível com o modelo de evolução por seleção de parentesco, o qual postula que o comportamento altruísta teria vantagens sob determinadas condições. Foram feitas estimativas de custos e benefícios do comportamento canibal (egoísta) e não-canibal (altruísta). Para isso, foram utilizados alguns parâmetros da ontogenia, como peso e volume do ovo, duração de cada ínstar e pupa, dias totais da eclosão até a emergência do adulto, taxa de crescimento, peso da pupa, área das asas, mortalidade de imaturos e sobrevivência sem alimento. Também se verificou o número de irmãos que chegam à fase adulta de canibais e não-canibais. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas para volume e peso do ovo (ovos de não-canibais foram menores do que de canibais), e para duração do primeiro ínstar, duração do estágio pupal e total de dias da eclosão até a fase adulta (canibais se desenvolveram mais rápido do que não-canibais). A mortalidade entre canibais e não-canibais não diferiu, mas a sobrevivência sem alimento dos canibais foi significativamente maior. Assim, alguns parâmetros da ontogenia indicaram algumas vantagens do comportamento canibal. No entanto, não-canibais deixaram aproximadamente o dobro de irmãos que chegaram à fase adulta, sendo que irmãos de canibais e de não-canibais tiveram um desenvolvimento igual. Duas modificações da regra de Hamilton foram feitas, a partir das quais se pode concluir que o reconhecimento de parentesco observado nessa espécie pode ter evoluído por seleção de parentesco. Não-canibais tiveram o benefício de deixar mais irmãos, mas sofreram o custo de ter o desenvolvimento um pouco mais lento, embora esses

custos tenham se restringido aos estágios imaturos. A segunda abordagem deste estudo, também uma consequência do trabalho de 2011, foi detectar onde está o sinal de reconhecimento no ovo, se no córion e/ou no embrião. Primeiramente, foram realizados testes de canibalismo lagarta-ovo entre meio-irmãos onde o pai era comum (não foi possível produzir meio-irmãos quando a mãe era comum porque em *Heliconius erato phyllis*, a fêmea é monândrica). A frequência de canibalismo foi comparada com trabalho anterior já referido, onde foi de 53% para ovos irmãos e de 83% para não-parentes. A frequência total de canibalismo observada neste experimento (83,7%) não diferiu da esperada para não-parentes, mas diferiu da frequência de canibalismo esperada para irmãos, sugerindo que lagartas meio-irmãs não reconhecem os ovos restantes como parentes. Este resultado, por si só, reforça a ideia de que a informação sobre o parentesco está no córion do ovo. Realizaram-se também testes de canibalismo entre lagartas para verificar se a informação sobre o parentesco estaria na cutícula que recobre as mesmas, ou em outras estruturas. Em testes de canibalismo entre lagartas de primeiro ínstar, irmãs e não-parentes, a frequência de canibalismo não diferiu significativamente, logo neste primeiro teste não houve evidência de que a fonte do reconhecimento estivesse na lagarta. Já em testes entre lagartas de diferentes instares foi possível categorizar diferentes comportamentos, os quais foram denominados de *indiferença*, *fuga*, *hostilidade*, *ataque* e *canibalismo*. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre lagartas irmãs e não-irmãs, para as categorias comportamentais analisadas. Esses resultados sugerem que o sinal avaliado para o reconhecimento de parentesco está no córion do ovo e não na lagarta. O terceiro enfoque desse estudo foi fazer inferências sobre o modo de herança do reconhecimento de parentesco (e canibalismo) nesta espécie, através de cruzamentos, entre canibais irmãos ($r = 0,5$) e não-parentes ($r = 0$), e entre não-canibais irmãos e não-parentes. A prole destes cruzamentos foi analisada quanto ao comportamento canibal e não-canibal. A ontogenia das lagartas canibais e não-canibais resultantes dos cruzamentos, bem como dos ovos restantes, foi acompanhada, a fim de verificar se existem diferenças no desenvolvimento entre indivíduos com diferentes coeficientes de endocruzamento. As variáveis analisadas foram peso e volume do ovo, duração

dos ínstaes e pupa, tempo total da eclosão até o adulto, taxa de crescimento, peso da pupa, área das asas e mortalidade de imaturos. Independentemente do comportamento parental, para $F = 0,25$, houve uma frequência elevada de não-canibais ($> 70\%$). Já para $F = 0$, a frequência de lagartas canibais foi alta ($> 50\%$). Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo não-endocruzado e endocruzado para peso da pupa e área das asas (endocruzados menores que não-endocruzados) e para mortalidade de imaturos (maior para endocruzados). Os resultados sugerem que o reconhecimento de parentesco tem um forte componente genético, enquanto que o canibalismo parece ser principalmente devido à ausência ou a poucos genes para reconhecimento, podendo ter importante influência ambiental. Por outro lado, o endocruzamento produziu efeitos no sentido de expressar a *depressão pelo endocruzamento*. Neste sentido, embora o presente trabalho utilizasse diferentes variáveis, ele confirmou os efeitos deletérios do endocruzamento, já publicados em artigo anterior, com a mesma espécie.

ABSTRACT

Kin recognition is important for the evolution of behaviors such as altruism and cooperation. Newly hatched caterpillars of *Heliconius erato phyllis* may be cannibals and recognize sibling eggs, preferentially cannibalizing non-kin when there is an option to cannibalize one or other. The present Dissertation comprises three related articles, specified below. The first approach was to try answering whether kin recognition observed in this species (demonstrated in a paper published in 2011 by the author), is compatible with the model of evolution by kin selection, which postulates that altruistic behavior is advantageous under given conditions. Costs and benefits of cannibalistic (selfish) and non-cannibalistic (altruist) behaviors were estimated. For this, a few parameters of ontogeny were used, such as egg weight and volume, duration of each instar and pupa, total days from hatching to adult emergence, growth rate, weight of the pupa, wings area, mortality of immatures and survival under starvation. The number of siblings of cannibals and non-cannibals that reach adulthood was also verified. The results showed that there were significant differences for egg volume and weight (non-cannibal eggs are smaller than cannibal ones), and for duration of the first instar during the pupal stage, and total number of days from hatching to the adult stage (cannibals develop faster than non-cannibals). There was no difference in mortality between cannibals and non-cannibals, but cannibal survival without food was significantly higher. Thus, a few parameters of ontogeny indicate a few advantages of cannibal behavior. However, non-cannibals leave approximately double the number of siblings that reach adulthood, and siblings of cannibals and non-cannibals have the same development. Two modifications of Hamilton's rule were made, from which it can be concluded that kin recognition observed in this species may have evolved by kin selection. Non-cannibals have the benefit of leaving more siblings, but suffer the cost of developing slightly slower, although these costs are limited to the immature stages. The second approach of this study, also a consequence of the 2011 work, was to detect where the recognition signal of the egg is, if in the chorion and/or in the embryo. First, cannibalism tests were

performed among half-siblings with the same father (it was not possible to produce half-siblings with the same mother, because in *Heliconius erato phyllis*, the female is monandric). The frequency of cannibalism was compared to the previous, aforementioned work, where it was 53% for sibling eggs and 83% for non-kin. The total frequency of cannibalism observed in this experiment (83.7%) is not different from that expected for non-kin, but different from the frequency of cannibalism expected for siblings, suggesting that half-sibling caterpillars do not recognize the remaining eggs as kin. This result in itself supports the idea that information about kinship is in the chorion of the egg. Cannibalism tests were also performed among caterpillars to verify whether the information about kinship could be in the cuticle that covers them, or in other structures. In cannibalism tests among first instar caterpillars that are siblings and non-kin, the frequency of cannibalism was not significantly different, thus, in this first test there was no evidence that the source of recognition was in the caterpillar. On the other hand, in tests among caterpillars from different instars, different behaviors could be categorized, and they were called *indifference*, *flight*, *hostility*, *attack* and *cannibalism*. There was also no statistically significant difference between sibling and non-sibling caterpillars, for the behavior categories analyzed. These results suggest that the signal evaluated for kin recognition is in the chorion of the egg, not in the caterpillar. The third approach of this study was to make inferences about the mode of inheritance of kin recognition (and cannibalism) in this species, by crosses, between sibling ($r = 0.5$) and non-kin ($r = 0$) cannibals, and between sibling and non-kin non-cannibals. The offspring of these crosses was analyzed regarding cannibal and non-cannibal behavior. The ontogeny of cannibal and non-cannibal caterpillars resulting from the crosses, as well as of the remaining eggs, was followed to find whether there were differences in the development among individuals with different coefficients of inbreeding. The variables analyzed were egg weight and volume, duration of instars and pupa, total time from hatching to adulthood, growth rate, weight of pupa, area of wings and immature mortality. Independently of the parental behavior, for $F = 0.25$ there was a high frequency of non-cannibals ($> 70\%$). On the other hand, for $F = 0$, there was a high frequency of cannibal caterpillars ($> 50\%$). There were statistically significant differences among the non-

inbred and the inbred group for weight of the pupa and wing area (inbred smaller than non-inbred), and for mortality of the immatures (greater for inbred). The results suggest that kin recognition has a strong genetic component, while cannibalism appears to be due mainly to the absence or to few genes for recognition, and may have suffered major environmental influence. On the other hand, inbreeding produced effects, in the sense of expressing inbreeding depression. In this sense, although the present study used different variables, it confirms the deleterious effects of inbreeding, already published in a previous article on the same species.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Reconhecimento de parentesco e seleção de parentesco

O reconhecimento de parentesco, a capacidade de um indivíduo reconhecer e preferencialmente se associar com indivíduos geneticamente relacionados (Green *et al.*, 2008), tem sido documentado em várias espécies de animais (as referências mais recentes incluem Arnold, 2000; Faraji *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2003; Giron e Strand, 2004; Sharp *et al.*, 2005; Lizé *et al.*, 2006; Kruczek, 2007; Moore, 2007; Sherborne *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2008; Schneider e Bilde, 2008; Dobler e Kölliker, 2010; Mehliis *et al.*, 2010; De Nardin e Araújo, 2011), em plantas (Dudley e File, 2007) e também em micetozoários (Mehdiabadi *et al.*, 2006, 2008; Ostrowski *et al.*, 2008).

Além da definição de reconhecimento de parentesco citada acima, existem outras definições que, segundo Penn e Frommen (2010), podem ser classificadas como descritivas, operacionais, mecânicas, além das baseadas no mecanismo cognitivo, origem e/ou função adaptativa.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como os indivíduos reconhecem seus parentes, e as classificações propostas para os mecanismos de reconhecimento de parentesco variam dependendo de como os pesquisadores definem o reconhecimento de parentesco (Penn e Frommen, 2010). De um modo geral, o reconhecimento de parentesco pode ser direto, quando é baseado em encontros com parentes, ou indireto, quando é baseado em outros contextos, tais como localização espacial (Waldman, 1988; Holmes, 2004; Buczkowski e Silverman, 2005). O reconhecimento de parentesco direto pode ser mediado por três mecanismos: 1) aprendizado social (ou associação anterior), 2) pareamento pelo fenótipo (*phenotype matching*) e 3) reconhecimento de alelos, no que é

denominado “efeito barba verde” (Dawkins, 1976; Blaustein, 1983). Somente os dois últimos mecanismos pelos quais um indivíduo reconhece (reconhecimento de alelos) ou aprende marcas fenotípicas de parentes ou suas próprias marcas (*phenotype matching*) permitem um verdadeiro reconhecimento já que marcas fenotípicas refletem um genótipo individual (Lizé *et al.*, 2006).

Muitas espécies podem distinguir parentes de não-parentes, e há evidências que corroboram todos os mecanismos propostos. Além disso, os vários tipos de mecanismos de reconhecimento de parentesco não são mutuamente exclusivos, pois eles podem ser usados por diferentes indivíduos de uma espécie, ou, eventualmente, eles podem mudar durante o desenvolvimento, idade ou uma condição ou contexto individual (Mateo, 2004; Penn e Frommen, 2010).

O reconhecimento de parentesco exige que o “remetente” (*sender*) produza marcas, ou sinais, que forneçam informações sobre o parentesco (Penn e Frommen, 2010). As marcas usadas para discriminar parentes de não-parentes podem ser visuais, auditivas ou olfatórias. O reconhecimento de parentes em insetos sociais comumente conta com marcas olfatórias associadas a lipídeos epicuticulares (Breed e Benett, 1987). Marcas olfatórias podem ser adquiridas exogenamente a partir do alimento, materiais do ninho, ou da rainha, mas elas também podem ser herdáveis e produzidas endogenamente através de transferência citoplasmática de marcas maternas ou produzidas pelo próprio indivíduo (Downs e Ratnieks, 1999). As marcas de parentesco devem ser altamente variáveis entre indivíduos, e esta variabilidade das marcas deve ser genética ou correlacionada com o parentesco, e também consistentes ou estáveis no desenvolvimento de cada indivíduo. As marcas de reconhecimento de parentesco podem funcionar especificamente para indicar parentesco, ou mais provavelmente elas são produzidas incidentalmente, sem função especial para comunicar parentesco (Penn e Frommen, 2010).

O reconhecimento inicia com a detecção sensorial (ou percepção) das marcas de reconhecimento pelos *receptores* (discriminadores). Usualmente, somente um tipo de modalidade sensorial é estudada, embora uma combinação possa estar envolvida (processo multi-modal) (Penn e Frommen, 2010). Depois

do reconhecimento, os *receptores* usam esta informação para tomar decisões, que são mecanismos de processamento cognitivo ou outras informações que controlam respostas comportamentais e outras (ou estocam a informação na memória). Decisões adaptativas também integram informação contextual sobre o estado ou motivação interna dos receptores, e outras informações relevantes. A importância dos limiares de aceitação contexto-dependentes não deve ser subestimada. As decisões do receptor o capacitam a tomar a decisão apropriada, que podem ser respostas fisiológicas, no desenvolvimento ou comportamentais, que resultam no tratamento diferencial de parentes (Gamboa *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1997; Liebert e Starks, 2004; Penn e Frommen, 2010). No entanto, como salientam os dois últimos autores, o reconhecimento não necessariamente leva a discriminação se, por exemplo, os custos percebidos pesam mais do que os benefícios. A falta de discriminação comportamental deve ser devida a falta de capacidade de reconhecimento (uma explicação mecânica) ou falha em satisfazer a regra de Hamilton (uma explicação evolutiva) (Mateo, 2002).

Rousset e Roze (2007) propuseram que a evolução do reconhecimento de parentesco poderia ser mediada por dois locos, um para identificação e outro para ajuda; eles fizeram simulações e examinaram como várias taxas de recombinação e dispersão (população espacialmente dividida) afetam a manutenção de polimorfismos. Eles encontraram que na ausência de mutação, a seleção elimina os polimorfismos em muitos casos, extinguindo o reconhecimento de parentesco e a ajuda devido aos benefícios para os marcadores comuns, como encontrado por Crozier (1986). Porém, quando eles reduziram a dispersão e recombinação entre os locos de identificação e de ajuda, os polimorfismos foram mantidos: marcadores raros se beneficiam de maiores níveis de ajuda, como Grafen (1990) sugeriu. Taxas de mutação crescentes ajudam a manter os polimorfismos em ambos os locos. A adição de uma vantagem seletiva extrínseca para alelos raros, tal como seleção-dependente de frequência negativa de parasitas, efetivamente mantém o reconhecimento de parentesco e a ajuda condicional (Gardner e West, 2007), como Crozier (1986) também sugeriu. Assim, espera-se que o

reconhecimento de parentesco genético dirigindo o nepotismo seja encontrado em espécies com baixa dispersão e recombinação (Penn e Frommen, 2010).

Embora existam estudos sobre a evolução do reconhecimento de parentesco (Waldman, 1991; Pfennig *et al.*, 1999), pouco é conhecido sobre as consequências para a aptidão da discriminação de parentesco (Blaustein *et al.*, 1991; Gamboa *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1997; Pfennig *et al.*, 1999).

O reconhecimento de parentesco é fundamental nas interações altruísticas, nas quais o agente altruísta sacrifica algo de sua aptidão individual para beneficiar o receptor. De modo geral, o altruísmo não pode evoluir sem que os indivíduos interagindo sejam mais relacionados do que a média da população (uma exceção a isso é exemplificada pela evolução do altruísmo recíproco – Trivers, 1971). A regra de Hamilton determina que o altruísmo é favorecido quando $rb - c > 0$, onde c é o custo na aptidão do altruísta de uma ação, b é o benefício para o favorecido pelo ato altruísta, e r é o parentesco genético entre ambos (Hamilton, 1964). (O parentesco genético é utilizado por estimar a proporção de genes compartilhados, ou a probabilidade de alelos em um loco escolhido aleatoriamente, entre dois indivíduos, serem compartilhados devido à descendência comum – coeficiente de parentesco r de Sewall Wright - Penn e Frommen, 2010). A desigualdade de Hamilton é extraordinariamente robusta, tendo sido re-derivada várias vezes sob diferentes condições biológicas (Herbers, 2009). A regra de Hamilton diz que o altruísmo tem maior probabilidade de se disseminar quando os benefícios para o receptor são grandes, o custo para o agente é baixo, e os participantes são parentes. Assim, Hamilton desenvolveu o conceito de aptidão inclusiva (*inclusive fitness*), destacando que a aptidão de um indivíduo pode ser dividida em dois componentes: a aptidão direta, que resulta da reprodução pessoal, e a aptidão indireta, que resulta da reprodução adicional dos parentes do altruísta, possibilitada pelas ações deste. A aptidão inclusiva cresce quando os parentes alcançam um sucesso acima e além do que teriam alcançado sem ajuda. A seleção natural que favorece a disseminação de alelos que aumentam o componente indireto da aptidão é chamada seleção de parentesco (*kin selection*). Assim, a teoria da seleção de parentesco fornece uma estrutura para compreender uma ampla faixa de interações sociais, incluindo o altruísmo,

cooperação, agressão, egoísmo e despeito (Griffin e West, 2002). O parentesco é uma medida estatística da similaridade genética e se refere especificamente aos locos cooperativos em questão (Hamilton, 1964); entretanto, é provável que o alto parentesco de um loco mostre em média uma correlação positiva com parentesco em outros locos através de todo o genoma (Buckling e Brockhurst, 2008).

A teoria da aptidão inclusiva representa um dos mais importantes avanços em biologia evolutiva (Griffin e West, 2002). Porém, apesar de amplamente aceita, há recente discussão sobre essa teoria (Nowak *et al.*, 2010), onde é discutida a importância que ela teria tido na evolução da eussocialidade (mais detalhes ver Discussão Geral).

O reconhecimento de parentesco baseado na genética pode ser potencialmente útil onde os animais não podem contar com familiaridade individual, como por exemplo onde fenótipos morfológicos mudam substancialmente com o tempo ou onde os irmãos provêm de ninhadas diferentes (Paterson e Hurst, 2009). Irmãos completos representam um importante grupo de parentes para reconhecer porque: primeiro, eles compartilham metade do seu genoma e então os custos do endocruzamento e os benefícios do altruísmo serão mais altos; e, segundo, eles frequentemente formam parte da mesma coorte de parceiros potenciais ou de co-específicos competindo por recursos (Griffin *et al.*, 2004). Além disso, enquanto populações naturais podem incluir indivíduos com vários graus de parentesco, qualquer mecanismo de reconhecimento de parentesco que seja incapaz de distinguir irmãos de indivíduos não relacionados, também será incapaz de reconhecer parentes mais distantes (Paterson e Hurst, 2009).

A discriminação de parentes com base na genética tem sido encontrada em diversos grupos de organismos marinhos coloniais (Crozier, 1986; Grosberg e Quinn, 1986). Larvas da ascídia colonial *Botryllus schlosseri* distinguem parentes de não-parentes com base em alelos compartilhados de um loco de histocompatibilidade altamente polimórfico, conhecido por regular a fusão entre colônias adultas (Grosberg e Quinn, 1986). Camundongos também contam com genes de histocompatibilidade (MHC) para a cooperação (Manning *et al.*, 1992) e para evitar o endocruzamento (Potts *et al.*, 1991). Larvas canibais da salamandra

tigre *Ambystoma tigrinum* usam sinais olfatórios “parente-específicos” com base genética para se alimentarem de não-parentes ($r = 0$), mas evitam comer parentes próximos, diferenciando até mesmo primos, onde $r = 1/8$ (Pfennig *et al.*, 1994). Componentes genéticos de reconhecimento também têm sido encontrados em artrópodes, incluindo isópodes subsociais (Linsenmair, 1987), coccinelídeos canibais (Joseph *et al.*, 1999), em abelhas eusociais (Greenberg, 1979; Moritz e Hillesheim, 1990), formigas (Beye *et al.*, 1998; Tsutsui *et al.*, 2000) e cupins (Adams, 1991). Contudo, componentes ambientais de reconhecimento de colônia têm sido evidenciados em muitas espécies sociais, incluindo formigas, vespas e abelhas. Os ratos toupeira eusociais, *Heterocephalus glaber*, também usam marcas ambientais para discriminar membros da colônia daqueles das colônias vizinhas (O’Riain e Jarvis, 1997). Em humanos, a discriminação pode ocorrer com base em características culturais, que são puramente ambientais (Lehmann e Perrin, 2002). Reconhecimento de parentesco também pode influenciar o comportamento de gametas, a fase haplóide do ciclo de vida (interações esperma-ovo e esperma-esperma) (Moore e Moore, 2002) e interações fetal-placentárias (Haig, 1996; Summers e Crespi, 2005).

Canibalismo e evolução

O canibalismo (predação intraespecífica) ocorre em uma ampla extensão de organismos e é uma característica comum em muitos ciclos de vida (Fox, 1975; Polis, 1981). A predação intraespecífica pode significativamente afetar o tamanho populacional e a estrutura etária, e é frequentemente referida como um mecanismo de regulação populacional (Via, 1999 e referências lá citadas). Oscilações nos números dos diferentes estágios de vida também podem ser causadas pelo canibalismo (Stevens, 1989), assim como o canibalismo pode alterar as relações competitivas tanto por eliminar competidores adicionais e por prover ao canibal benefícios nutricionais (Fox, 1975; Via, 1999). Entre insetos não-carnívoros, os canibais usualmente são juvenis e frequentemente consomem

ovos (Richardson *et al.*, 2010). Esse comportamento pode ter se originado a partir do consumo do córion dos ovos pelos neonatos (1º ínstar) (Watanabe e Yamaguchi, 1993; Barros-Belanda e Zucoloto, 2001, 2005). Canibais também frequentemente consomem outros juvenis, geralmente de tamanho corporal menor. O canibalismo é mais frequentemente atribuído a fatores densidade-dependentes do que densidade-independentes. Porém, a probabilidade de canibalizar também pode ser influenciada por fatores independentes da densidade, incluindo condições ambientais abióticas como alta temperatura, baixa umidade e precipitação, assincronia com a planta hospedeira (ex. quando neonatos eclodem antes das plantas hospedeiras estarem disponíveis), pobre qualidade nutricional da planta hospedeira (ou pouca disponibilidade de plantas hospedeiras), assincronia no desenvolvimento dentro das populações, disponibilidade de coespecíficos vulneráveis (devido à doença, parasitismo, injúria ou muda) e uma predisposição genética ou fenotípica para canibalizar (Richardson *et al.*, 2010). O canibalismo na mariposa *Mamestra brassicae* pode estar sob controle de um único gene (Richter, 1986). Já o canibalismo em *Diatraea grandiosella* está sob controle genético aditivo (Tarpley *et al.*, 1993). O canibalismo em insetos não carnívoros é taxonomicamente difundido, tendo sido documentado em espécies filogeneticamente ancestrais e derivadas (Richardson *et al.*, 2010).

O canibalismo pode conferir benefícios diretos para a aptidão, na forma de sobrevivência, taxa de desenvolvimento, ou fecundidade aumentadas (Fox, 1975; Duelli, 1981; Joyner e Gould, 1985; Via, 1999; Zago-Braga e Zucoloto, 2004). Zago-Braga e Zucoloto (2004), por exemplo, em estudo realizado com *Ascia monuste* (Lepidoptera; Pieridae), constataram que o canibalismo ocorrendo no início do desenvolvimento (bem como a ingestão de córion – Barros-Belanda e Zucoloto, 2001) reduz o tempo de desenvolvimento nesta espécie. Duelli (1981), em estudo realizado com *Chrysopa carnea* (Neuroptera; Chrysopidae) utilizou três fatores (tempo de desenvolvimento, sobrevivência larval e fecundidade) para estimar um índice relativo de potencial reprodutivo de populações canibais e não-canibais. Ele observou que o canibalismo aumentou a capacidade reprodutiva das populações teste, na situação em que alimento com menos de 1,6 mg (10% do

peso corporal de uma larva de terceiro ínstar) era oferecido por dia por larva. Outros benefícios incluem a remoção de competidores potenciais (Fox, 1975; Polis, 1981; Kakimoto *et al.*, 2003), a redução na probabilidade de atrair predadores (Chapman *et al.*, 2000) e a colonização de novos ambientes que poderia ser facilitada por taxas de canibalismo aumentadas (Via, 1999). Um benefício adicional do canibalismo diz respeito à aptidão inclusiva, onde o indivíduo canibal pode aumentar a sobrevivência e reprodução de indivíduos relacionados por eliminar indivíduos competidores não relacionados. A teoria da aptidão inclusiva prevê que canibais que podem reconhecer parentes e evitar comê-los devem ter vantagem sobre indivíduos que não têm essa capacidade. Em essência, evitar o canibalismo de parentes é uma forma de nepotismo, e qualquer gene que codifique este comportamento deveria difundir-se porque ele promove a sobrevivência de cópias dele mesmo (Pfennig, 1997).

Os benefícios da predação intraespecífica devem ser pesados contra três custos claros (Williams e Hernández, 2006). Primeiro, os canibais têm risco de morte ou injúria a partir das respostas defensivas dos coespecíficos. Segundo, o canibalismo pode reduzir a aptidão inclusiva através do consumo de um parente. Terceiro, canibais podem ter maior risco de transmissão de doenças e parasitas hospedeiro-específicos. Além disso, o canibalismo, em alguns casos, pode resultar em custos mesmo ao longo do desenvolvimento. Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), canibais têm uma taxa de desenvolvimento mais lenta, menor sobrevivência e menor tamanho corporal quando comparados a não-canibais (Chapman *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 2000).

O benefício nutricional do canibalismo não precisa ser grande para o mesmo evoluir: mesmo uma pequena diminuição no tempo de desenvolvimento do canibal em uma espécie com sobreposição de gerações pode fornecer vantagem seletiva suficiente para causar a disseminação do canibalismo, mesmo de irmãos-completos (Eickwort, 1973; Via, 1999).

Espécies canibais são ideais para testar hipóteses para o reconhecimento de parentesco, porque a discriminação de parentes pode ser particularmente bem desenvolvida nessas espécies (Pfennig *et al.*, 1999). Há vários trabalhos relatando sobre espécies canibais que identificam e evitam comer parentes, como

peixes poecilídeos (Loekle *et al.*, 1982), o peixe *Pimephales promelas* (Green *et al.*, 2008), o pica-pau *Melanerpes formicivorus* (Mumme *et al.*, 1983), salamandras da espécie *Ambystoma tigrinum* (Pfennig *et al.*, 1994), girinos de *Scaphiopus bombifrons* (Pfennig *et al.*, 1993), muitas espécies de roedores (Elwood, 1992), o tatuzinho do deserto *Hemilepistus reaumuri* (Linsenmair, 1987), o anfípode *Apherusa jurinei* (Patterson *et al.*, 2008), bem como os ácaros *Phytoseiulus persimilis* e *P. macropilis* (Schausberger e Croft, 2001).

Quanto ao canibalismo em insetos, há estudos que encontraram evidência para discriminação baseada no parentesco em *Gerris thoracicus*, *G. swakopensis* e *Limnoporus refoscutellatus* (Heteroptera) (Nummelin, 1989), *Labidomera clivicollis* (Coleoptera) (Dickinson, 1992), *Adalia bipunctata* (Coleoptera) (Agarwala e Dixon, 1993), *Harmonia axyridis* (Coleoptera) (Joseph *et al.*, 1999) e *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera) (De Nardin e Araújo, 2011). Entretanto, outros estudos não encontraram evidências para discriminação de parentesco em *Harmonia axyridis* (Coleoptera) (Osawa, 1989), *Arctocorisa carinata* e *Callicorixa producta* (Hemiptera) (Pajunen e Pajunen, 1991), *Aquarius remigis* e *Limnoporus dissortis* (Heteroptera) (Cárcamo e Spence, 1994), *Utheteisa ornatrix* (Lepidoptera) (Hare e Eisner, 1995) e *Trichoprosopon digitatum* e *Toxorhynchites moctezuma* (Diptera) (Sherratt *et al.*, 1999). Em *Plagiodera versicolora* (Coleoptera) também não foi encontrada correlação entre canibalismo e parentesco (Goff e Stevens, 1995).

No caso particular de Lepidoptera, muitas lagartas são canibais que ingerem ovos, lagartas e algumas vezes pupas, o que foi evidenciado por vários pesquisadores (Brower, 1961; Schweitzer, 1979; Joyner e Gould, 1985; Tarpley *et al.*, 1993; Hare e Eisner, 1995; Pierce, 1995; Reed *et al.*, 1996; Boots, 1998; Chapman *et al.*, 1999; Sigsgaard *et al.*, 2002), particularmente no Brasil, por Barros-Bellanda e Zucoloto (2001, 2005) e Zago-Braga e Zucoloto (2004). Entretanto, a maioria desses trabalhos não tratam do reconhecimento de parentes, apenas relatam o canibalismo. No entanto, o trabalho de De Nardin e Araújo (2011) mostrou que as lagartas recém-eclodidas de *Heliconius erato phyllis* reconhecem parentes biológicos, de tal maneira que a frequência de canibalismo

nestes é significativamente inferior à frequência de canibalismo entre indivíduos não-parentes.

O gênero *Heliconius* e o canibalismo na filogenia dos heliconíneos

O gênero *Heliconius*, com aproximadamente 40 espécies (Reed *et al.*, 2011), juntamente com os gêneros proximamente relacionados *Laparus*, *Eueides* e *Neruda*, é um dos grupos mais conhecidos de borboletas neotropicais, e tem sido importante em estudos de processos evolutivos (Beltrán *et al.*, 2007). O gênero *Heliconius* tem sido intensamente estudado nos últimos anos sob vários aspectos; cito apenas a título de exemplo: evolução e desenvolvimento (Joron *et al.*, 2006; Ferguson e Jiggins, 2009), genômica (Papanicolaou, 2008; Counterman *et al.*, 2010), seleção natural e sexual e o possível conflito entre ambas na evolução de alguns fenótipos (Estrada e Jiggins, 2008; Cardoso *et al.*, 2009; Klein e Araújo, 2010), mimetismo e conservação de populações naturais (Giraldo *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2011), morfometria tradicional e geométrica (Borges *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2011), comportamento (De Nardin e Araújo, 2011), biogeografia evolutiva (Cardoso, 2010), especiação (Jiggins *et al.*, 2008). Embora esta seja uma amostra pequena da literatura disponível sobre *Heliconius*, é possível notar que este gênero tem se tornado um modelo de organismo para diferentes enfoques. À semelhança de *Drosophila*, o gênero *Heliconius* é de fácil criação e os indivíduos podem viver vários meses, o que o torna altamente recomendável para trabalhos experimentais.

Heliconius erato (Linnaeus, 1758) é uma borboleta de cores vivas, com padrões de cor variáveis e que está distribuída do México à América Central e do Sul. É adaptada a altitudes que variam do nível do mar a 1600 m e é frequentemente encontrada voando em pastagens abertas em florestas perturbadas e de crescimento secundário (DeVries, 1987).

Heliconius erato phyllis (Lepidoptera; Nymphalidae) (Figura 1) é uma subespécie amplamente estudada que habita principalmente o sul, sudeste e leste do Brasil. Os adultos têm baixa dispersão, reúnem-se em dormitórios comunais ao anoitecer, mantendo o local de repouso por meses, e os indivíduos jovens aprendem com os mais velhos a localização das flores para alimentação e locais de repouso (Santos e Araújo, 1991); além disso, há sobreposição de gerações. As fêmeas desta espécie examinam a planta antes de ovipositarem, e depositam os ovos individualmente. Um dos motivos para esses cuidados é detectar a presença de outros ovos na mesma planta, pois as lagartas são canibais e podem canibalizar ovos ainda não eclodidos.



Figura 1 - *Heliconius erato phyllis*. A: ovo (aproximadamente 1,5 mm de altura e 0,9 mm de diâmetro); B: lagarta de 5º inst ar; C: adulto.

Entre os heliconíneos, há lagartas gregárias (quando no mínimo há dez ovos ou larvas juntos), solitárias e aquelas que geralmente colocam ovos solitários mas ocasionalmente colocam alguns poucos ovos juntos. Entre as solitárias estão *Heliconius melpomene*, *H. cydno*, *H. heurippa*, *H. pachinus*, *H. timareta*, *H. numata*, *H. ismenius*, *H. elevatus*, *H. pardalinus*, *H. hecale*, *H. atthis*, *H. erato*, *H. hermathena*, *H. himera*, *H. clysonimus*, *H. telesiphe*, *H. hortense*, *Eueides lampeto*, *E. procula*, *E. lineata*, *E. isabella*, *E. heliconoides*, *E. alipha*, *E. lybia*, *E. tales*, *Dryas iulia*, *Dryadula phaetusa*, *Podotricha telesiphe*, *Philaetria dido*, *Philaetria diatonica*, *Dione glycera* e *Agraulis vanillae*. O grupo de espécies com lagartas gregárias inclui *Neruda aoede*, *N. metharme*, *Heliconius burneyi*, *H. wallacei*, *H. egeria*, *H. hecuba*, *H. hierax*, *H. xanthocles*, *H. eleuchia*, *H. congener*, *H. sapho*, *H. hewitsoni*, *H. sara*, *H. leucadia*, *H. antiochus*, *H. ricini*, *Eueides vibilia*, *E. pavana*, *Dione junonia*, *D. moneta* e *Laparus doris*. Já entre as solitárias que ocasionalmente colocam ovos juntos estão *Heliconius besckei*, *H. ethilla*, *H.*

nattereri, *H. hecalesia*, *H. demeter*, *H. charitonia* e *H. peruvianus* (Beltrán *et al.*, 2007). O comportamento gregário das lagartas evoluiu pelo menos três vezes a partir de um ancestral solitário (Beltrán *et al.*, 2007). Apesar de muitas espécies serem solitárias, o canibalismo só foi relatado em *Heliconius erato* e *Dryas iulia* (Brown e Mielke, 1972 e DeVries, 1987). Nas espécies gregárias, ou solitárias mas tolerantes, não há relato de canibalismo.

Objetivos

Avaliar aspectos relativos ao reconhecimento de parentesco e canibalismo em *Heliconius erato phyllis* e suas consequências em termos adaptativos, dentre eles os seguintes:

1. Acompanhar o desenvolvimento de lagartas canibais e não-canibais de *Heliconius erato phyllis*, para avaliar os custos e os benefícios do comportamento altruísta de não canibalizar, a fim de inferir se o reconhecimento de parentesco nesta espécie evoluiu por seleção de parentesco (Capítulo 2).

2. Detectar onde está o sinal de reconhecimento no ovo. Pretende-se verificar se o sinal de reconhecimento está no córion do ovo ou no embrião (Capítulo 3).

3. Realizar cruzamentos, em viveiros, entre canibais irmãos ($r = 0,5$) e não-parentes ($r = 0$), e entre não-canibais irmãos e não-parentes. A prole destes cruzamentos será analisada quanto ao comportamento canibal e não-canibal, na tentativa de encontrar associação entre comportamento e/ou reconhecimento de parentesco e a herança (Capítulo 4).

4. Analisar a prole dos cruzamentos mencionados no item anterior, quanto aos efeitos do endocruzamento na mortalidade geral e em variáveis do desenvolvimento (Capítulo 4).

CAPÍTULO 2

Costs and benefits of cannibalistic and non-cannibalistic caterpillars and their correlates with kin selection in a butterfly

(Artigo submetido)

Redigido segundo as normas da revista *Behavioral Ecology*.

As tabelas e a figura estão junto ao texto, e não nas últimas páginas, como seria o formato para submissão, para facilitar a leitura do artigo.

1 **Costs and benefits of cannibalistic and non-cannibalistic caterpillars and**
2 **their correlates with kin selection in a butterfly**

3

4

5 Janaína De Nardin ^{1,2} e Aldo Mellender de Araújo ^{1,2}

6

7 ¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade
8 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

9

10 ² Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de
11 Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS,
12 Brasil.

13

14

15 Corresponding Author – Aldo Mellender de Araújo:

16

17 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av.
18 Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal
19 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6717 Fax: +55 51 3316-7311.

20 E-mail: aldo1806@gmail.com

21

22 **Costs and benefits of cannibalistic and non-cannibalistic caterpillars and**
23 **their correlates with kin selection in a butterfly**

24

25

26 **Abstract**

27

28

29 Newly hatched caterpillars of *Heliconius erato phyllis* may be either cannibals or
30 non-cannibals. A previous study showed that first instar caterpillars distinguish
31 eggs that are their siblings, from non-sibling eggs, preferentially cannibalizing the
32 non-siblings. The purpose of this study was to evaluate differences in the
33 ontogenetic development of cannibal and non-cannibal caterpillars of *H. erato*
34 *phyllis*, and to verify the number of siblings that reach adulthood, left by each of
35 these groups, as a way of estimating costs/benefits of cannibalistic/non-
36 cannibalistic behavior. Our framework is the kin selection theory, where non-
37 cannibalistic behavior is altruistic. Eggs were weighed and the volume of each one
38 estimated, from females collected in nature. Cannibalism tests were performed,
39 where, on an equilateral triangle of green stiff paper, 0.5 cm on each side, an egg
40 was placed on each vertex, all of them siblings. After the caterpillar emerged, the
41 cannibalistic/non-cannibalistic behavior towards the remaining eggs was
42 examined. The variables analyzed were egg weight and volume, total number of
43 days from hatching to adulthood, growth rate, weight of the pupa, size of the
44 wings, mortality of immatures and survival of immatures under starvation. There
45 were significant differences for egg volume and weight (cannibal > non-cannibal),

46 and for duration of the first instar and the pupa (cannibal < non-cannibal). Mortality
47 among cannibals and non-cannibals was not different, but survival of cannibals
48 under conditions of starvation was significantly greater. Non-cannibals leave
49 approximately double the number of siblings to reach adulthood, and siblings of
50 cannibals and non-cannibals develop in the same way. Two modifications were
51 made in Hamilton's rule, based on which it can be concluded that kin recognition
52 observed in this species may have evolved by kin selection. Non-cannibals have
53 the benefit of leaving more siblings, but suffer the cost of slightly slower
54 development, although these costs are limited to the immature stages.

55

56

57 Key-words: cannibalism, Hamilton's rule, kin recognition, *Heliconius*, Lepidoptera.

58

59

60 **Lay Summary**

61

62

63 Cannibalism is a widespread behavior among animals, particularly insects. A
64 special case in point is the neotropical butterfly *Heliconius erato phyllis*, whose
65 young caterpillars can cannibalize eggs. It is, however, interesting that some
66 caterpillars can recognize their kin and avoid eating siblings. There is a big
67 difference between the frequency of caterpillar-egg cannibalism between siblings
68 and non-related ones. This study went a bit further and attempted to estimate the
69 costs and benefits of cannibalizing a sibling or non-relative, and to find evidence of

70 the evolutionary significance of both behaviors, to cannibalize or not (in other
71 words being a selfish or an altruist caterpillar). For this investigation we studied
72 many characteristics of the life cycle of that butterfly, from egg hatching to
73 pupation and imagoes. Our results indicate that both behaviors can be favored by
74 natural selection and that as a consequence, they can continue to exist in natural
75 populations. Finally, *Heliconius* is one of the most studied butterflies, with many
76 species, being responsible for the elucidation of the genetics and evolution of
77 mimicry, and other important subjects of evolutionary biology.

78

79

80 **Introduction**

81

82

83 Cannibalism is a very common behavior in several species, and it consists
84 in eating all or part of a conspecific (Fox 1975; Elgar and Crespi 1992). A
85 consequence of cannibalism is that sometimes an individual has to choose
86 between cannibalizing kin or non-kin (Pfennig 1997). Many papers report on
87 cannibal species where individuals can identify and avoid eating kin (Loekle et al.
88 1982; Linsenmair 1987; Elwood 1992; Pfennig et al. 1993; Pfennig et al. 1994;
89 Shausberger and Croft 2001; Green et al. 2008; Patterson et al. 2008;).

90 In insects, there are several reports which have found evidence for
91 recognition based on kinship (Nummelin 1989; Dickinson 1992; Agarwala and
92 Dixon 1993; Joseph et al. 1999; De Nardin e Araújo 2011). However, there are
93 other studies where no evidence of kin recognition is reported; Osawa (1989), for

94 instance, utilized the same species as Agarwala and Dixon (1993), but with
95 different conclusions. No recognition was also reported by Pajunen and Pajunen
96 (1991), Goff and Stevens (1995), Hare and Eisner (1995) e Sherratt et al. (1999).

97 Cannibal species are ideal to test for kin recognition, because the
98 recognition mechanisms can be especially well developed (Pfennig et al. 1999).
99 There are two possible explanations for the evolution of kin recognition: the classic
100 theory of kin selection (Hamilton 1964) and the theory of inbreeding avoidance
101 (Bateson 1978). A cannibal that is able to recognize a relative can act for its own
102 genetic benefit because it shares genes with the relative and they can both
103 propagate them, including recognition genes; alternatively, the recognition of kin
104 can be the basis for negative assortative mating, avoiding the loss of fitness
105 through inbreeding.

106 Altruism is the possible outcome of kin selection given that the inequality
107 $rb - c > 0$ is satisfied, where r is the coefficient of relationship between altruist and
108 receptor, b is the amount of benefit to the fitness of the receptor and c is a
109 corresponding cost in fitness for the altruist (Hamilton 1964). If this is true, altruists
110 have an indirect benefit due to the reproduction of relatives which can be added to
111 their own reproduction (*inclusive fitness*).

112 For many organisms costs and benefits can be estimated, so that
113 Hamilton's rule can be applied. The theory of inclusive fitness predicts that
114 cannibals that recognize relatives and do not cannibalize them should be favored
115 as compared to individuals that are not able to do so. Their behavior is altruistic
116 and any gene responsible for such behavior, which promotes more copies of itself,

117 should increase in frequency at the expense of those individuals that are not able
118 to recognize them (Pfennig 1997).

119 Cannibalism may confer direct benefits for fitness as increasing survival
120 and/or fecundity, and decreasing total development time (Fox 1975; Duelli 1981;
121 Joyner and Gould 1985; Via 1999; Barros-Belanda and Zucoloto 2001; Zago-
122 Braga and Zucolotto 2004). Other benefits include the removal of potential
123 competitors (Fox 1975; Polis 1981; Kakimoto et al. 2003), lessening the probability
124 of attracting predators (Chapman et al. 2000) and the colonization of new
125 environments which could be facilitated by increasing rates of cannibalism (Via
126 1999). Another benefit of cannibalism, in the case of kin recognition, is that a
127 cannibal could enhance the survival and reproduction of related individuals by
128 eliminating non-related competitors, thereby increasing its inclusive fitness.

129 However the benefits of cannibalism could be reduced by taking into
130 account three additional costs (Williams and Hernández 2006): 1. cannibals are at
131 risk of death or injury depending on the defensive responses of conspecifics; 2.
132 cannibals may eventually reduce their inclusive fitness by consuming a relative; 3.
133 cannibals could increase the risk of transmission of diseases and host-specific
134 parasites.

135 Females of the butterfly *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)
136 inspect the hostplant before oviposition and lay eggs individually. The reason for
137 such behavior is to detect other eggs or immatures in the same plant, since
138 caterpillars are cannibals. De Nardin and Araújo (2011) showed that first instar
139 caterpillars are able to recognize sibling eggs; the frequency of sib cannibalism
140 was 34% when a caterpillar had the choice between cannibalizing a sibling or a

141 non-kin. When confronted with only sibling eggs the frequency of cannibalism was
142 approximately 50%, which is significantly lower than the frequency of cannibalism
143 of only non-kin eggs ($\approx 80\%$).

144 Given that kin recognition was shown, the objective of the present work was
145 to estimate costs and benefits of cannibal behavior (selfish) and non-cannibal
146 behavior (altruist). These estimates were used to test Hamilton's rule and to infer
147 whether kin recognition could have evolved through kin selection.

148

149

150 **Material and Methods**

151

152

153 *Keeping stocks of females*

154

155 Females were collected in five populations around the city of Porto Alegre,
156 capital of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (30°04'31"S; 51°07'00"W). Two of
157 these populations were approximately 1 km distant separated by the buildings of
158 the University, and the remaining were at least 25 km distant from each other, so
159 all females could be assumed to be non-relatives. A total of 12 females were
160 caught and they were the primary source of the eggs used in the cannibalism
161 tests. Details of the procedures used to collecting eggs and rearing immatures can
162 be found in De Nardin and Araújo (2011).

163

164 *Parameters of ontogeny and estimates of costs and benefits of altruists (non-*
165 *cannibals)*

166

167 To estimate costs of non-cannibals, some variables of the ontogenetic
168 development such as survival and adult size (see below) were compared between
169 non-cannibals and cannibals. As for estimates of their benefits, we compared the
170 number of siblings of both cannibals and non-cannibals that reached the adult
171 stage.

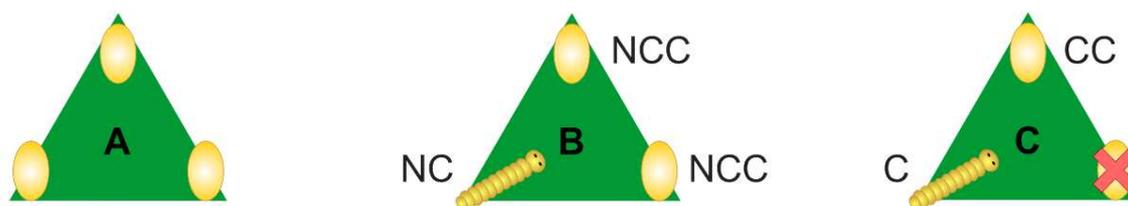
172 Eggs were weighed in an analytic balance (BOSCH-Wägesysteme GmbH
173 D-72417; accuracy of 0.0001 g). Each egg was weighed three times in
174 succession, and their average used in all subsequent tests. Egg volume was
175 estimated by the expression of the spheroid volume (Rashidi et al. 2008):

176
$$V_{spheroid} = \pi \frac{LD^2}{6}$$

177 where L is the length from the base to the apex of the egg, and D is the diameter
178 of the egg (we used the largest value of the diameter). These measurements were
179 done under a binocular stereoscopic microscope (Nikon, model SMZ645).

180 Cannibalism/non-cannibalism tests were performed according to the
181 protocol of De Nardin and Araújo (2011). For each test, where sibling eggs were
182 put in the vertices of an equilateral triangle (Figure 1), only eggs from a single
183 female were used, to ensure that they were full sibs (females of *Heliconius erato*
184 *phyllis* are monandric - Drummond III 1984). Each test lasted 45 minutes.
185 Afterwards a cannibal or non-cannibal caterpillar was identified by a number and
186 by the code C or NC, respectively. In both situations there remained at least one

187 egg, which was identified as CC (cannibal control; when two eggs were
188 cannibalized, no control remained) or NCC (non-cannibal control, comprising the
189 two remaining eggs of a non-cannibal caterpillar).



190

191 Figure 1 – Experimental design of this study. A) Three sibling eggs were
192 arranged on the vertices of an equilateral triangle (made of green light cardboard,
193 with a 0.5 cm side). B) A non-cannibal caterpillar (NC) and the altruists' siblings
194 (NCC). C) A cannibal caterpillar (C) and the sibling of a selfish individual (CC).
195 Egg marked with “X” means cannibalized.

196

197 Caterpillars were reared in translucent, plastic pots (8.5 cm height x 7.5 cm
198 diameter), with a white cap. To keep a certain degree of moisture, a piece of paper
199 towel was placed at the bottom of the pot. All caterpillars were maintained at 25 °C
200 ± 1 °C of temperature with a 12h light/12h dark photophase; they were fed daily
201 with plenty of *Passiflora suberosa*. All development was followed with some
202 variables being estimated in order to compare cannibal and non-cannibal
203 caterpillars: egg weight and volume, duration of each instar, pupal weight, adult
204 size (measured by the area of forewings and hindwings), the total growth rate (R)
205 and mortality from hatching until adult emergence. We also estimated the time
206 expended under starvation, until death, for first instar caterpillars.

207

208 Pupae were weighed after 24h of pupation and the growth rate (R)
calculated by the expression given in Smiley (1978); the denominator means the

209 number of days after egg hatching until pupation. Wing area was calculated by the
210 software ImageJ 1.37v. (Wayne Rasband NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

$$211 \quad R = \frac{\left(\frac{\text{pupal weight}}{\text{egg weight}} \right)^{\frac{1}{5}} - 1}{\frac{\text{days}}{5}}$$

212 Soon after hatching, some caterpillars, in the tests to detect cannibalism,
213 were separated and isolated to test resistance to starvation (both cannibals and
214 non-cannibals). They were put in plastic vials without leaves of the hostplant, to
215 estimate how long they could survive. Whenever death occurred between 0 h and
216 6 a.m. the time of death was conventionally stipulated as 3 a.m.

217 Statistical analysis was done using software SPSS v.15.0 for all parametric
218 variables; both one-way and two-way analysis of variance were performed, after
219 appropriate statistical transformations. Our first approach was to use two-way
220 analysis of variance considering behavior (cannibal x non-cannibal) and the
221 locality from where female butterflies came. Although there were significant
222 differences between localities, but no behavior x locality interaction we decided to
223 use only one-way analysis of variance considering cannibal and non-cannibal
224 behavior; in addition, the sample sizes for some localities were too small to obtain
225 reliable results. Furthermore, although it is known that cannibalism can be
226 environmentally dependent, this was not our main question. To test for sexual
227 differences for cannibalism/non-cannibalism, we did a two-way analysis of
228 variance for the same variables as before; however, the results were non-
229 significant. For some variables, such as the number of dead immatures, cannibal
230 and non-cannibal were compared by a G test with Williams correction (Sokal and

231 Rohlf 1995) by using software BioEstat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/>
232 download/).

233 As for the estimates of the benefits of an altruist, the number of its siblings
234 (two for each test) which reached adulthood was compared with the survival to
235 adulthood of the only sibling of a cannibal (it should be reminded that in those
236 instances of cannibalism, there generally remained one sibling – sometimes
237 none). To test for the differences, a goodness of fit G-test with Williams correction
238 was used. The two control groups, CC and NCC, were independently compared
239 for the same variables of cannibals and non-cannibals. This was done to answer
240 the following question: do they have the same capacity to reach adulthood?

241 Since in the beginning of the analysis it seemed that non-cannibals had
242 lower values for egg weight and volume, we decided to compare both variables
243 along the life span of the females in an insectary. The questions were: are eggs
244 laid in the first half bigger/smaller than in the second half? Is there any relationship
245 between the age of a female and the weight-volume of the eggs it lays? It should
246 be reminded that *Heliconius* butterflies can live for months, laying three eggs daily
247 in average, so the questions seemed relevant.

248 An interesting question raised during the analysis above was: is the size of
249 the egg whose caterpillar became cannibal of the same magnitude as those from
250 the cannibalized egg and the remaining egg (CC)? The same question was asked
251 about the size of non-cannibal egg and controls (NCC). Non-hatched eggs were
252 not included in the analysis, only those eggs that gave origin to an adult.

253

254 *Applications of Hamilton's Rule*

255

256 The application of Hamilton's rule followed two approaches: in the first we
257 adapted the inequality proposed by Brown (1975) to estimate the fitness of the
258 altruist. Altruistic (non-cannibal) behavior would be favored by selection if:

$$\frac{G}{L} > \frac{r_{xs}}{r_{xa}}$$

259

260 where G = the number of full siblings of an altruist which reached adulthood due to
261 the altruistic act (non-cannibalize); L = number of full siblings of a selfish caterpillar
262 (cannibal) reaching adulthood; r_{xa} = probability that a sibling of an altruist carries
263 an altruistic gene that is identical by descent; r_{xs} = probability that a sibling of a
264 selfish individual carries a specified gene that is identical by descent. We added a
265 second term in the right side of this inequality, taking into account the survival
266 probability of siblings of non-cannibals and cannibals (NCC and CC, respectively):

$$\frac{G}{L} > \frac{S}{A} \cdot \frac{r_{xs}}{r_{xa}}$$

267

268 where A is the survival probability of an altruist's sibling until adulthood and S is
269 the survival probability of the sibling of a selfish individual until adulthood. The
270 probability of survival was estimated by the multiplication of the frequency of
271 survival for each instar and the pupal stage.

272 The second approach was taken from Eickwort (1973), who established the
273 condition for cannibalism to be maintained in the population: if $p / p' < 2$, then
274 cannibalism prevails, where p is the survival probability to reach the adult stage for

275 altruists (non-cannibals) and p' is the corresponding probability for selfish
276 individuals (cannibals).

277

278

279 **Results**

280

281

282 *Parameters of ontogeny and estimates of costs and benefits of altruists (non-*
283 *cannibals)*

284

285 Table 1 shows all estimates for the elements of ontogeny (means \pm
286 standard deviation) for cannibals and non-cannibals (a), and respective controls
287 (b); below each column is the probability of rejecting the null hypothesis in a one-
288 way ANOVA (the possibility of using a multivariate analysis of variance was
289 excluded due to the strict dependence of each instar/stage from the previous).
290 Right and left wing area were correlated (forewing: $r = 0.982$; $P < 0.01$; hindwing:
291 $r = 0.977$, $P < 0.01$); we showed only the value for the right forewing.

292

293

294 Table 1 – Summary statistics (mean \pm s.d.) for the twelve variables used in this
295 study, by experimental group (a - Cannibal, Non-Cannibal; b - Cannibal Control
296 and Non-Cannibal Control). The values are in the original units, but the ANOVA
297 was always with transformed units. The rows starting with P show the results for
298 accepting or rejecting the respective null hypotheses.

Group	Egg Volume (mm ³) ¹	Egg Weight (mg) ¹	Duration of each pre-adult stage (days) ²						Days from hatching until adulthood ²	Growth Rate (R)	Pupal Weight (g) ¹	Right Forewing Area (mm ²) ³	N
			L1	L2	L3	L4	L5	Pupa					
CANNIBAL	0.6299	0.6299	3.35	2.05	2.19	2.65	4.09	8.56	22.86	0.9399	0.3929	462.00	59
	± 0.0720	± 0.0814	± 1.09	± 0.62	± 0.67	± 0.61	± 1.35	± 1.18	± 2.91	± 0.1541	± 0.0615	± 55.31	
NON-CANNIBAL	0.5936	0.5845	3.81	2.20	2.37	2.91	4.18	9.32	24.70	0.8881	0.3871	447.53	53
	± 0.0681	± 0.0676	± 1.07	± 0.66	± 0.97	± 0.78	± 0.93	± 1.57	± 3.15	± 0.1242	± 0.0462	± 51.54	
<i>P</i>	0.007	0.003	0.011	0.299	0.504	0.118	0.399	0.003	0.001	0.069	0.702	0.334	–
CANNIBAL CONTROL	0.6261	0.6340	3.34	2.21	2.18	2.76	4.21	8.49	23.23	0.9000	0.3882	461.86	39
	± 0.0554	± 0.0682	± 1.05	± 0.87	± 0.61	± 0.75	± 0.98	± 1.19	± 2.59	± 0.1256	± 0.0548	± 51.72	
NON-CANNIBAL CONTROL	0.6256	0.6041	3.34	2.31	2.32	2.63	4.44	8.81	24.69	0.8987	0.3976	468.27	63
	± 0.0510	± 0.0577	± 1.06	± 0.96	± 0.78	± 0.93	± 1.05	± 1.19	± 2.66	± 0.1321	± 0.0558	± 53.08	
<i>P</i>	0.978	0.026	0.929	0.691	0.581	0.305	0.245	0.164	0.300	0.959	0.429	0.591	–

¹ Cubic root transformation

² Logarithmic base 10 transformation

³ Square root transformation

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

There are several important points to comment concerning Table 1: at the beginning and at the end of their life cycles, cannibals and non-cannibals differ (egg volume and weight, and length of first instar and pupa and length of development from hatching until adult life). As the eggs of cannibals are larger than those of non-cannibals, one could ask whether smaller eggs are intrinsically destined to be altruists. We are planning to do experiments to answer this question. The difference between cannibals and non-cannibals as to the length of the first instar is expected, since the former gain an extra meal. These differences still persist in the following instars, although they are not significant. This pattern is maintained during the pupal stage, which is faster in cannibals and in the total length of development from hatching to adulthood. The growth rate (R), a composite variable, does not seem to be affected, although the probability of accepting the null hypothesis was close to rejection. In short, cannibals have a faster development than non-cannibals (altruists); actually, from this perspective,

314 developmental time is a cost for non-cannibals. It is noticeable that no significant
315 differences were observed for the respective controls (Table 1b), even when
316 mortality during development was estimated (this comparison was also made for
317 cannibals and non-cannibals and will be referred to below).

318 As to mortality during development, there was no difference between
319 cannibals (N = 70, deaths = 11) and non-cannibals (N = 65, deaths = 12) (G-test
320 with Williams correction = 0.1759; d.f. = 1; $P = 0.6749$). Survival tests in a hunger
321 regime for the 1st instar caterpillars indicate a greater survival of cannibals
322 ($44 \text{ h} \pm 9$; N = 40) than of non-cannibals ($39 \text{ h} \pm 9$; N = 40) (ANOVA: $P = 0.023$).
323 However, the weight and volume of cannibal and non-cannibal caterpillar eggs are
324 not correlated to survival without food. The non-cannibals appear to have costs
325 during ontogeny, mainly at the beginning of development, since 1st instar
326 caterpillars developed faster, and in a starvation regime they survive longer. After
327 all, an individual that stops cannibalizing may suffer the costs of renouncing a
328 meal. A difference was observed in the pupal stage, with cannibals also
329 developing faster. However, over the long term, the non-cannibals do not appear
330 to suffer costs, since the growth rate, weight of the pupa and size of adults are not
331 different from those found for cannibals.

332 The benefits of the altruists (non-cannibals) were estimated by comparing
333 the number of siblings that reached adulthood among selfish individuals and
334 altruists. Thus, since the expected ratio of the number of altruists' siblings to
335 selfish individuals is 2:1, the number of individuals of the CC group was added to
336 those of the NCC group (Table 1b), making up a total of 102, and this value was
337 then distributed with a 2:1 ratio, equivalent to 68:34. This proportion is not different

338 from the observed one, 63:39 (G test with Williams correction = 1.0734; $P =$
339 0.3002), i.e., non-cannibals leave approximately double the number of siblings
340 than cannibals.

341 The development of individuals in the cannibal control and non-cannibal
342 control groups was followed (Table 1b), and it can be seen that they are not
343 different for any of the variables analyzed, i.e., siblings of selfish individuals are
344 not different from those of altruists, and they apparently have the same potential to
345 reach the reproductive phase. The only exception, which might be irrelevant, is the
346 difference between egg weight for CC and NCC groups. We have no reason to
347 suspect that, been correlated egg volume and weight for both groups (see below),
348 that difference express a true biological problem. As to mortality during
349 development, there is no difference between the cannibal control (N = 46,
350 deaths = 7) and non-cannibal control (N = 79, deaths = 16) (G test with Williams
351 correction = 0.4896; $P = 0.4841$).

352 Other results not included in Table 1 are: 1. The variation of egg weight and
353 volume per female, was not different along the life span (this was split into two
354 halves and compared by a two-way analysis of variance).

355 2. There is a correlation between weight and volume of the egg for the
356 cannibal ($r = 0.686$; $P = 0.01$), non-cannibal ($r = 0.499$; $P = 0.01$), non-cannibal
357 control ($r = 0.459$; $P = 0.01$) groups, as well as for the cannibal control group
358 ($r = 0.670$; $P = 0.01$).

359 3. Cannibal caterpillar eggs are not different in weight ($P = 0.802$) or in
360 volume ($P = 0.362$) from the cannibalized eggs. The eggs of cannibals are not
361 different in weight ($P = 0,963$) from the remaining viable eggs (CC) or in volume

362 ($P = 0.743$). On the other hand, non-cannibals do not weigh differently from the
363 remaining eggs of the cannibalism tests (NCC) ($P = 0.101$), but their volume
364 ($P = 0.006$) is different, the eggs of group NCC being larger in volume than those
365 of group NC.

366 4. The sex ratio is not different among cannibals, non-cannibals, cannibal
367 control and non-cannibal control (G test with Williams correction = 1.3344,
368 $P = 0.7210$), the sex ratio being 1:1 for all groups.

369

370 *Applications of Hamilton's Rule*

371

372 Applying the results found here to modify Hamilton's Rule that we adapted
373 from Brown (1975) led to the following result:

$$\frac{G}{L} > \frac{S}{A} \cdot \frac{r_{xs}}{r_{xa}} \Rightarrow \frac{2}{1} > \frac{0.5 \times 0.847}{0.5 \times 0.815} \Rightarrow 2 > 1.04$$

374

375 which means that the altruists are fitter than the selfish individuals, and are
376 therefore able to remain in the population.

377 On the other hand, applying our results according to Eickwort (1973), where
378 $p / p' < 2$, we have $p'_{\text{cannibal}} = 0.847$ and $p_{\text{non-cannibal}} = 0.815$, therefore $p / p' = 0.96$.
379 This relation shows that, although altruists and selfish individuals have
380 approximately the same probabilities of survival, the selfish ones also have a
381 greater probability, ensuring that they will remain in the population, sometimes with
382 a relatively high frequency.

383

384

385 **Discussion**

386

387

388 Based on the results presented, it can be concluded that the costs for the
389 altruists occur at the beginning of development: cannibal caterpillars molt to the 2nd
390 instar faster than non-cannibals. Similar results were obtained by Osawa (2002)
391 and Michaud (2003), both of them with Coleoptera. On the other hand, Tarpley et
392 al. (1993) did not find differences on studying the development of *Diatraea*
393 *grandiosella* (Lepidoptera). The interesting fact discussed by the authors is the
394 possibility that there may be an association between cannibalism and weight gain,
395 but only smaller larvae had the propensity to be cannibals. The duration of the
396 pupal period was also shorter in cannibals, thus, butterflies from cannibal
397 caterpillars emerge before the non-cannibal ones. Under starvation, the cannibal
398 caterpillars also have a higher survival rate. According to Michaud and Grant
399 (2004), faster development means earlier reproductive maturity and less exposure
400 to predation.

401 However, for the duration of the other instars (L2, L3, L4, L5), the rate of
402 development, pupal weight, size of adults and mortality during development, the
403 non-cannibals (altruists) do not appear to be suffering costs. According to Michaud
404 and Grant (2004), a larger adult size would mean a greater potential fecundity for
405 females and several potential advantages associated with larger energy reserves.

406 The non-cannibals, on the other hand, appear to leave double the number
407 of siblings that reach the reproductive age and, as both siblings of cannibals and

408 of non-cannibals develop the same in all variables analyzed, there is truly a benefit
409 from no longer cannibalizing.

410 However, it is observed that, although non-cannibals leave double the
411 number of siblings, cannibalism frequently occurs (the frequency of cannibalism of
412 sibling eggs is around 53%, and of non-kin 83% - De Nardin and Araújo 2011).
413 Although no advantages of cannibals are observed in various variables analyzed,
414 the nutritional benefit of cannibalism does not have to be great for this behavior to
415 evolve: even a small reduction in the development time of the cannibal, in a
416 species where generations overlap may supply a selective advantage sufficient to
417 cause the dissemination of cannibalism, even of full-siblings (Eickwort 1973; Via
418 1999). Generally, only a few studies have tried to explain the evolution of
419 cannibalism (Eickwort 1973). However, literature regarding cannibalistic behavior
420 generally does not highlight the selective advantages, but concentrates on
421 ecological phenomena that presumably act to reduce cannibalism, such as
422 separation of habitats of different instars, or stepwise emergence and dispersion of
423 siblings (Buskirk et al. 1984).

424 According to Barros-Bellanda and Zucoloto (2005), cannibalism may be
425 due, for instance, to the low nutritional content of plant tissues and/or to the
426 influence of competition. According to Zucoloto (1993), the adaptation of a
427 population of *Ceratitis capitata* (Tephritidae) to a diet based on animal protein
428 probably occurred due to cannibalization during periods of competition for food.
429 Lizé et al. (2006) suggest that the competition induced by the limited dispersion
430 capacity of the larvae of *Aleochara bilineata* (Coleoptera) may have favored the
431 evolution of recognition of kin in this solitary species. *Heliconius erato phyllis* also

432 has a limited dispersion, and this viscosity of the population may lead to a high
433 frequency of the meeting between caterpillars and eggs, which could be enough to
434 make kin recognition evolve.

435 According to Watanabe and Yamaguchi (1993), egg cannibalism can be an
436 advantage for larval survival, because it ensures the acquisition of nutrients.
437 Sometimes, survival of the first instar and its foraging success may be related to
438 cannibalism (Michaud and Grant 2004), since this period is often critical and
439 limiting for the larva. Survival, when there is a lack of food which might lead to
440 extinction, is often cited as one of the reasons for the evolution of cannibalism
441 (Cushing 1991; Claessen et al. 2004).

442 It was observed that the cannibal caterpillars develop faster than the non-
443 cannibals in the first instar (see mean times in column L1 of Table 1a). This could
444 be due to the nutritional contribution supplied by the egg consumed. However, the
445 time of duration of the first instar of the two control groups (Table 1b column L1)
446 that did not have the chance of being cannibals, is very similar to the time of the
447 cannibals. Thus the doubt remains as to whether this slower development of the
448 non-cannibals is a consequence of the fact that they did not consume an egg, or a
449 consequence of the fact that the eggs from which they were born are smaller,
450 which might result in smaller caterpillars, that would take longer to change to the
451 second instar. In this study it was not possible to look at the causes of this
452 difference.

453 Our data do not indicate the existence of a variation of weight and volume
454 of the eggs during the laying period of each female. As it was observed that the
455 weight and volume of the non-cannibal eggs are smaller, this shows that the

456 cannibalism of the offspring is not influenced by the mother's age. Chew and
457 Robbins (1984), in turn, reported that the age of females may affect the weight and
458 size of the eggs produced. They cite Telfer and Rutberg (1960), Murphy (1981)
459 and Jones et al. (1982), who noticed that eggs produced by the individuals
460 become smaller as the females age. Wiklund e Persson (1983), also observed a
461 similar progression in *Pararge aegeria* (speckled wood butterfly), but
462 demonstrated that the weight of the egg is not correlated to the hatchability,
463 mortality, growth of the larva and weight of the pupa.

464 Comparing the eggs of cannibal caterpillars and the cannibalized eggs, it
465 was observed that they are equal in weight and volume, indicating that
466 cannibalism did not occur due to some deficiency in the cannibalized eggs, but
467 probably for nutritional gain (or to eliminate potential competitors), which may be
468 inferred from the comparison with the remaining eggs of the cannibalism tests.
469 Another interesting issue concerns the non-cannibal caterpillar eggs, which have a
470 smaller volume than the remaining eggs; currently we do not have a satisfactory
471 explanation for this.

472 Hamilton's rule, applied in this study, allows us to explain why both the
473 selfish (cannibal) behavior and the altruistic (non-cannibal) one remain in the
474 populations. There is evidence that the recognition of kinship that occurs in
475 *H. erato phyllis* may have evolved by kin selection, since the Hamilton inequality
476 appears to be obeyed. Although we did not measure the costs and benefits in a
477 same unit, it could be observed that altruists potentially leave double the number
478 of siblings, and do not have development costs after pupation. On the other hand,

479 cannibals appear to have short term benefits, and in foodless survival, which may
480 be very important in situations where there is competition and little food available.

481

482

483 **Acknowledgments**

484

485

486 We are grateful to all colleagues of the Ecological Genetics laboratory, which
487 helped in rearing immatures and butterflies during the total period of this study. A
488 special thank to Rodrigo De Nardin for his support in many aspects of this work.
489 To the laboratory of Plant Genetics for the use of the analytic balance. This project
490 was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
491 (CNPq), which also was responsible for the scholarship to J.D.N.

492

493

494 **References**

495

496

497 Agarwala BK, Dixon AFG. 1993. Kin recognition: egg larval cannibalism in *Adalia*
498 *bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur J Entomol. 90:45-50.

499 Barros-Bellanda HCH, Zucoloto FS. 2001. Influence of chorion ingestion on the
500 performance of *Ascia monuste* and its association with cannibalism. Ecol
501 Entomol. 26:557-561.

502 Barros-Bellanda HCH, Zucoloto FS. 2005. Egg cannibalism in *Ascia monuste* in
503 the field; opportunistic, preferential and very frequent. *J Ethol.* 23:133-138.

504 Bateson P. 1978. Sexual imprinting and optimal outbreeding. *Nature* 273:659-660.

505 Brown JL. 1975. The evolution of social behavior. New York: Norton. Appendix, p.
506 735 – 736.

507 Buskirk RE, Frohlich C, Ross KG. 1984. The natural selection of sexual
508 cannibalism. *Am Nat.* 123:612-625.

509 Chapman JW, Williams T, Martínez AM, Cisneros J, Caballero P, Cave RD,
510 Goulson D. 2000. Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera,
511 Noctuidae) reduce the risk of predation? *Behav Ecol Sociobiol.* 48:321-327.

512 Chew, FS, Robins RK. 1984. Egg-laying in butterflies. In: Vane-Wright RI, Ackery
513 PR, editors. The biology of butterflies. London: Academic Press, Symposium of
514 the Royal Society Entomological Society of London 11:65-79.

515 Claessen D, De Roos AM, Persson L. 2004. Population dynamic theory of size-
516 dependent cannibalism. *Proc R Soc B.* 271:333–340.

517 Cushing JM. 1991. A simple model of cannibalism. *Math Biosc.* 107:47-71

518 De Nardin J, Araújo AM. 2011. Kin recognition in immatures of *Heliconius erato*
519 *phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *J Ethol.* 29:499–503.

520 Dickinson JL. 1992. Egg cannibalism by larvae and adults of the milkweed leaf
521 beetle (*Labidomera clivicollis*, Coleoptera: Chrysomelidae). *Ecol Entomol.*
522 17:209–218.

523 Drummond III BA. 1984. Multiple mating and sperm competition in the
524 Lepidoptera. In: Smith RL, editor. Sperm Competition and the Evolution of
525 Animal Mating Systems. London: Academic Press, Inc, p. 291-370.

- 526 Duelli P. 1981. Is larval cannibalism in lacewings adaptive? (Neuroptera:
527 Chrysopidae). Res Pop Ecol. 23:193-209.
- 528 Eickwort KR. 1973. Cannibalism and kin selection in *Labidomera clivivollis*
529 (Coleoptera: Chrysomelidae). Am Nat. 107:452-453.
- 530 Elgar MA , Crespi BJ. 1992. Cannibalism. Ecology and evolution among diverse
531 taxa. Oxford: Oxford University Press.
- 532 Elwood R. 1992. Pup-cannibalism in rodents: causes and consequences. In Elgar
533 MA, Crespi BJ, editors. Cannibalism: ecology and evolution among diverse
534 taxa. Oxford: Oxford University Press.
- 535 Fox LR. 1975. Cannibalism in natural populations. Annu Rev Ecol Syst. 6:87- 06.
- 536 Goff PW, Stevens L. 1995. A test of Hamilton's rule: cannibalism and relatedness
537 in beetles. Anim Behav. 49:545-547.
- 538 Green WW, Mirza RS e Pyle GG. 2008. Kin recognition and cannibalistic
539 behaviours by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*).
540 Naturwissenschaften 95:269-272.
- 541 Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I. J Theor Biol.
542 7:1-16.
- 543 Hare JF, Eisner T. 1995. Cannibalistic caterpillars (*Utetheisa ornatix*; Lepidoptera:
544 Arctiidae) fail to differentiate between eggs on the basis of kinship. Psyche
545 102:27-33.
- 546 Jones RE, Hart JR, Bull GD. 1982. Temperature, size and egg production in the
547 cabbage butterfly, *Pieris rapae* (L). Aust J Zool. 30:223-232.

548 Joseph SB, Snyder WE, Moore AJ. 1999. Cannibalizing *Harmonia axyridis*
549 (Coleoptera: Coccinellidae) larvae use endogenous cues to avoid eating
550 relatives. J Evol Biol. 12:792-797.

551 Joyner K, Gould F. 1985. Developmental consequences of cannibalism in
552 *Heliothis zea* (Lepidoptera, Noctuidae). Ann Entomol Soc Am. 78:24-28.

553 Kakimoto T, Fujisaki K, iyatake T. 2003. Egg laying preference, larval dispersion
554 and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Ann
555 Entomol Soc Am. 96:793-798.

556 Linsenmair KE. 1987. Kin recognition in subsocial arthropods, in particular in the
557 desert isopod *Hemilepistus reaumuri*. In: Fletcher DJC, Michener CD, editors.
558 Kin recognition in animals. Wiley, Chichester, p. 411-436.

559 Lizé A, Carval D, Cortesero AM, Fournet S, Poinot D. 2006. Kin discrimination
560 and altruism in the larvae of a solitary insect. Proc R Soc Lond. [Biol] 273: 2381-
561 2386.

562 Loekle DM, Madison DM e Christian JJ. 1982. Time dependency and kin
563 recognition of cannibalistic behaviour among Poeciliid fishes. Behav Neural
564 Biol. 35:315-318.

565 Michaud JP. 2003. A comparative study of larval cannibalism in three species of
566 ladybird. Ecol Entomol. 28:92-101.

567 Michaud JP, Grant AK. 2004. Adaptive significance of sibling egg cannibalism in
568 Coccinellidae: comparative evidence from three species. Ann Entomol Soc Am.
569 97:710-719.

570 Murphy DD, Launer AE, Ehrlich PR. 1981. The role of adult feeding in egg
571 production and population dynamics of the checkerspot butterfly *Euphydryas*
572 *editha*. *Oecologia* 56: 257-263.

573 Nummelin M. 1989. Cannibalism in water striders (Heteroptera: Gerridae). Is there
574 kin recognition? *Oikos* 56:87-90.

575 Osawa N. 1989. Sibling and non-sibling cannibalism by larvae of a lady beetle
576 *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in the field. *Res Pop Ecol.*
577 31:153-160.

578 Osawa N. 2002. Sex-dependent effects of sibling cannibalism on life history traits
579 of the ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol J Linn*
580 *Soc.* 76:349-360.

581 Pajunen VI, Pajunen I. 1991. Oviposition and egg cannibalism in rock-pool
582 (Hemiptera: Corixidae). *Oikos* 60:83-90.

583 Patterson L, Dick JTA, Elwood RW. 2008. Embryo retrieval and kin recognition in
584 an amphipod (Crustacea). *Anim Behav.* 76:717-722.

585 Pfennig DW. 1997. Kinship and cannibalism. *BioScience* 47:667-675.

586 Pfennig DW, Reeve HK, Sherman PW. 1993. Kin recognition and cannibalism in
587 spadefoot toad tadpoles. *Anim Behav.* 46:87-94.

588 Pfennig DW, Sherman PW, Collins J P. 1994. Kin recognition and cannibalism in
589 polyphenic salamanders. *Behav Ecol.* 5:225-232.

590 Pfennig DW, Collins JP, Ziemba RE. 1999. A test of alternative hypotheses for kin
591 recognition in cannibalistic tiger salamanders. *Behav Ecol.* 10:436-443.

592 Polis GA. 1981. The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annu Rev*
593 *Ecol Systemat.* 12:225-251.

594 Rashidi M, Malekiyan M, Gholami M. 2008. Egg volume determination by spheroid
595 approximation and image processing. *World Appl Sci J.* 3:590-596.

596 Schausberger P, Croft BA. 2001. Kin recognition and larval cannibalism by adult
597 females in specialist predaceous mites. *Anim Behav.* 61:459–464.

598 Sherratt TN, Ruff SE, Church SC. 1999. No evidence for Kin Discrimination in
599 Cannibalistic Tree-Hole Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Insect Behav.*
600 12:123-132.

601 Smiley JT (1978) The host plant ecology of *Heliconius* butterflies in Northeastern
602 Costa Rica. Austin: The University of Texas at Austin; 198 p.

603 Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry.* 3 ed. New York: W. H. Freeman and
604 Company.

605 Tarpley MD, Breden F, Chippendale GM. 1993. Genetic control of geographic
606 variation for cannibalism in the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella.*
607 *Entomol Exp Appl.* 66:145-152.

608 Telfer W, Rutberg L. 1960. The effects of blood protein depletion on the growth of
609 the oocytes in the *Cecropia* moth. *Biol Bull.* 114:352-366.

610 Via S. 1999. Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour
611 beetle, *Tribolium castaneum.* *Heredity* 82:267-275.

612 Watanabe M, Yamaguchi H. 1993. Egg cannibalism and egg distribution of two
613 *Pieris* butterflies, *Pieris rapae* and *P. melete* (Lepidoptera, Pieridae) on a host
614 plant, *Rorippa indica* (Cruciferae). *Jpn J Ecol.* 43:181–188

615 Wiklund C, Persson A. 1983. Fecundity, and the relation of egg weight variation to
616 offspring fitness in the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*, or why don't
617 female butterflies lay more eggs? *Oikos* 40:53-63.

- 618 Williams T, Hernández O. 2006. Costs of cannibalism in the presence of an
619 iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*. *Ecol Entomol.* 31:106-113.
- 620 Zago-Braga RC, Zucoloto FS. 2004. Cannibalism studies on eggs and newly
621 hatched caterpillars in a wild population of *Ascia monuste* (Godart)
622 (Lepidoptera, Pieridae). *Rev Bras Entomol* 48:415-420.
- 623 Zucoloto FS. 1993. Adaptation of a *Ceratitis capitata* population Diptera,
624 Tephritidae to an animal protein-based diet. *Entomol Exp Appl.* 67:119-127.

CAPÍTULO 3

Uma abordagem experimental para testar a fonte da informação sobre o parentesco em imaturos de uma borboleta

(Artigo em preparação)

Redigido segundo as normas da revista *Animal Behaviour*.

As tabelas estão junto aos resultados, e não nas últimas páginas como seria o formato para submissão, para facilitar a leitura do artigo.

1 **Uma abordagem experimental para testar a fonte da informação sobre o**
2 **parentesco em imaturos de uma borboleta**

3

4

5 Janaína De Nardin ^{1,2}, Bruna Oliveira Missaggia ¹ e Aldo Mellender de Araújo ^{1,2}

6

7 ¹ Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de
8 Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS,
9 Brasil.

10 ² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade
11 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

12

13

14

15 Correspondência – Aldo Mellender de Araújo:

16

17 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av.
18 Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal
19 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6717 Fax: +55 51 3316-7311.

20 E-mail: aldo1806@gmail.com

21

22 Quantidade de palavras: 4737

23

24

25 **Resumo**

26

27

28 Lagartas recém-eclodidas de *Heliconius erato phyllis* reconhecem ovos irmãos,
29 canibalizando preferencialmente os não-parentes, quando há escolha. O objetivo
30 deste trabalho foi verificar onde está a informação para reconhecimento do ovo,
31 se no córion (origem materna) e/ou no embrião. Primeiramente, foram realizados
32 testes de canibalismo lagarta-ovo entre meio-irmãos onde o pai era comum. A
33 frequência de canibalismo foi comparada com trabalho anterior onde foi de 53%
34 para ovos irmãos e de 83% para não-parentes. A frequência total de canibalismo
35 observada neste experimento (83,7%) não diferiu da esperada para não-parentes,
36 mas difere da frequência de canibalismo esperada para irmãos, sugerindo que
37 lagartas meio-irmãs não reconhecem os ovos restantes como parentes. Foram
38 implementadas também duas etapas de testes de canibalismo entre lagartas. Na
39 primeira delas, realizaram-se testes de canibalismo entre lagartas de primeiro
40 ínstar, irmãs e não-parentes, onde as duas lagartas foram mantidas juntas em
41 potes plásticos com alimento em abundância, até que uma das lagartas
42 canibalizasse a outra, ou uma delas fizesse a muda para o 2º ínstar. A frequência
43 de canibalismo entre lagartas de primeiro ínstar irmãs e não-parentes não diferiu
44 significativamente. Na outra etapa de testes, duplas de lagartas irmãs ou não-
45 parentes foram colocadas frente-a-frente, a 0,5 cm uma da outra. As duplas
46 consistiam de lagartas de 1º e 3º ínstar, e de lagartas de 2º e 4º ínstar. Também
47 não houve diferença estatisticamente significativa entre lagartas de ínstar
48 diferentes, irmãs e não-parentes, para as categorias comportamentais analisadas.

49 Os resultados destas duas últimas etapas, combinado com os testes de
50 canibalismo lagarta-ovo entre meio-irmãos onde o pai era comum, sugerem que o
51 sinal avaliado para o reconhecimento de parentesco está no córion do ovo.

52

53

54 Highlights: Apesar de haver reconhecimento de parentesco lagarta-ovo, não
55 parece ocorrer reconhecimento lagarta-lagarta em *Heliconius erato phyllis*. O sinal
56 utilizado para reconhecer parentes está no córion do ovo. Lagartas não tratam
57 lagartas irmãs e não-parentes diferencialmente. Ovos de meio-irmãos paternos
58 são tão canibalizados quanto de não-parentes.

59

60

61 Palavras-chave: canibalismo, reconhecimento de parentesco, sinal para
62 reconhecimento, córion do ovo, *Heliconius*, Lepidoptera.

63

64

65 **Introdução**

66

67

68 O reconhecimento de parentesco, a capacidade de distinguir parentes de
69 não-parentes usando similaridade genética ou qualquer marca que seja
70 correlacionada com o parentesco (Holmes 2004), tem sido evidenciado em várias
71 espécies de animais, tanto vertebrados como invertebrados (as referências mais
72 recentes incluem Sharp et al. 2005; Lizé et al. 2006; Kruczek 2007; Moore 2007;

73 Sherborne et al. 2007; Green et al. 2008; Patterson et al. 2008; Schneider & Bilde
74 2008; Mehliis et al. 2010; De Nardin & Araújo 2011), em plantas (Dudley & File
75 2007) e também em micetozoários (Mehdiabadi et al. 2006, 2008; Ostrowski et al.
76 2008).

77 Segundo Hamilton (1964), os indivíduos podem se beneficiar por
78 comportarem-se de maneira altruísta com seus parentes, aumentando assim sua
79 aptidão inclusiva. O processo de reconhecimento de parentesco envolve três
80 componentes: a expressão de marcas fenotípicas únicas (*cues, labels*), a
81 percepção dessas marcas e o grau de correspondência com o “modelo de
82 reconhecimento” (*recognition template*) e a ação tomada pelo avaliador como
83 função da similaridade percebida entre o modelo e o fenótipo encontrado (Mateo
84 2004 e referências lá indicadas).

85 As marcas usadas para discriminar parentes de não-parentes podem ser
86 visuais, auditivas ou olfatórias. A produção de uma marca que indica a identidade
87 do remetente (*sender*) é uma questão importante, porque ela pode mediar o
88 reconhecimento de parentesco e então ter um impacto significativo na aptidão do
89 remetente, beneficiando-o com atos altruístas (Lizé et al. 2010).

90 O reconhecimento de parentes em insetos sociais comumente conta com
91 quimiorrecepção associada a hidrocarbonetos epicuticulares (Howard & Blomquist
92 2005; Lizé et al. 2010). Hidrocarbonetos cuticulares têm diversas funções em
93 insetos e servem como marcas químicas em processos de reconhecimento
94 durante interações interindividuais (Howard & Blomquist 2005; Dronnet et al.
95 2006). Entretanto, para insetos solitários, pouco é conhecido sobre o tipo de
96 marca utilizada no reconhecimento (Lizé et al. 2010).

97 As lagartas recém-eclodidas da borboleta *Heliconius erato phyllis*
98 reconhecem irmãos biológicos, canibalizando preferencialmente os ovos não-
99 parentes em experimentos com escolha. Quando apenas ovos irmãos estão
100 disponíveis, a frequência de canibalismo é significativamente inferior a frequência
101 de canibalismo de quando apenas ovos não-parentes estão disponíveis (De
102 Nardin & Araújo 2011). Entretanto, não se sabe qual a fonte de informação do
103 parentesco, se no córion do ovo e/ou no próprio embrião em desenvolvimento.
104 Assim, o objetivo deste trabalho foi testar experimentalmente onde estaria a
105 informação para reconhecimento no ovo, se no córion (que tem origem apenas
106 materna) e/ou no embrião.

107

108

109 **Métodos**

110

111

112 *Manutenção dos estoques de fêmeas*

113

114 A manutenção dos adultos da borboleta *Heliconius erato phyllis* foi feita em
115 viveiros com cerca de 2 m x 2 m x 3 m, em área adjacente ao Departamento de
116 Genética da UFRGS (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) cujo interior é
117 composto de muitas plantas para simular as condições naturais, incluindo
118 *Passiflora misera*, *P. suberosa* e *P. capsularis*, plantas em que as fêmeas de
119 *H. erato phyllis* ovipositam, e das quais as lagartas se alimentam (no presente
120 trabalho a alimentação das lagartas foi feita apenas com *P. suberosa*). A

121 alimentação das borboletas foi feita diariamente, através de pequenos recipientes
122 contendo uma mistura de água, mel e pólen.

123

124 *O sinal de reconhecimento de parentesco no ovo está no córion ou no embrião?*

125

126 Para verificar se o sinal de reconhecimento no ovo tem origem paterna/
127 materna ou de ambos, foram feitos testes de canibalismo lagarta-ovo entre meio-
128 irmãos onde o pai era comum. As fêmeas são monândricas (Drummond III 1984),
129 portanto não é possível a realização de testes de canibalismo entre meio-irmãos
130 nos quais a mãe é a mesma. É sabido que o córion tem origem nas células
131 foliculares maternas (Telfer 2009). Dessa forma, se o sinal de reconhecimento
132 está no córion (de origem materna), seria esperado que as lagartas recém-
133 eclodidas não reconhecessem ovos meio-irmãos paternos como parentes. Por
134 outro lado, se o sinal de reconhecimento está presente no embrião, seria
135 esperado que houvesse reconhecimento de meio-irmãos, expresso por uma
136 frequência de canibalismo menor do que a esperada para não-parentes. Para que
137 isso fosse verdade, o sinal presente no embrião teria que ultrapassar o córion, o
138 que poderia ser possível através das aerópilas, pequenas aberturas nas carenas
139 dos ovos (ver Dell’Erba et al. 2005).

140 Foram feitos cruzamentos em viveiro onde um mesmo macho copulou com
141 duas fêmeas, todos não aparentados entre si. Foram realizadas sete repetições
142 deste teste (sete “trios”: um macho que copulou com duas fêmeas).

143 Os ovos foram dispostos nos vértices de um triângulo equilátero (feito de
144 papel cartolina verde) de 0,5 cm de lado. Em cada teste foram utilizados dois ovos

145 provenientes de uma das fêmeas (irmãos completos) e um ovo oriundo da outra
146 fêmea (portanto meio-irmão paterno dos demais). Os triângulos foram mantidos
147 em placas de Petri, com diâmetro de 8 cm e altura de 1,5 cm, em temperatura
148 ambiente, sobre um papel toalha levemente umedecido para evitar a desidratação
149 dos ovos. A variável analisada, após a eclosão da lagarta meio-irmã das demais
150 foi a ocorrência ou não do canibalismo desta em relação aos ovos restantes
151 (irmãos completos), durante 45 minutos. Foram realizadas 43 repetições. As
152 repetições em que nasceu primeiro um dos ovos irmãos foram desconsideradas,
153 principalmente pelo pequeno número amostral (de qualquer modo a informação
154 seria análoga).

155 A frequência de canibalismo observada foi comparada com a frequência de
156 canibalismo esperada para irmãos completos e para não-parentes encontrada em
157 De Nardin & Araújo (2011). A análise estatística foi feita através de um Teste-G
158 de independência, com correção de Williams, através do programa BioEstat 5.0
159 (<http://www.mamiraua.org.br/download/>).

160

161 *Canibalismo entre lagartas*

162

163 Um teste complementar ao anterior foi o do canibalismo entre lagartas, o qual
164 consistiu de duas etapas: na primeira, testou-se o canibalismo entre lagartas de
165 primeiro ínstar e na segunda, o canibalismo entre ínstars diferentes. Em
166 consequência do teste anterior, nossa hipótese nula foi de que lagartas não se
167 reconhecem.

168 Na primeira etapa de testes, foram feitos testes de canibalismo entre lagartas
169 de 1º instar, irmãs e não-parentes. Esse teste é importante porque a lagarta de 1º
170 instar é a larva embriônica saída do ovo, sem ter feito a primeira muda. Duas
171 lagartas foram colocadas juntas em potes plásticos, translúcidos, com tampa
172 branca (8,5 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro), com folhas jovens de *Passiflora*
173 *suberosa* em abundância. O fundo do pote foi coberto com papel absorvente
174 branco, para reter a umidade. O final do teste ocorria quando uma das lagartas
175 canibalizava a outra, ou até que uma delas fizesse a muda para o 2º instar. Foi
176 feita a comparação da frequência de canibalismo de lagartas irmãs (N = 30) e
177 não-parentes (N = 30) através de um teste-G de independência com correção de
178 Williams.

179 Na segunda etapa de testes, duplas de lagartas irmãs ou não-irmãs,
180 saciadas, foram colocadas frente-a-frente, a 0,5 cm uma da outra, em um ramo de
181 *Passiflora suberosa*, sem folhas, aderido no sentido horizontal a uma placa de
182 petri, com diâmetro de 10 cm e altura de 1,5 cm, sem tampa. As duplas de
183 lagartas consistiam de uma lagarta de 1º instar e uma de 3º, ou de uma lagarta de
184 2º e uma de 4º instar (o objetivo neste caso foi o de criar uma assimetria de
185 tamanho). Cada repetição consistia em cinco observações de 10 minutos para
186 cada dupla, em sequência. Em cada observação foram anotadas as ocorrências
187 das seguintes categorias comportamentais: indiferença, fuga, hostilidade, ataque
188 e canibalismo. O comportamento descrito aqui como indiferença foi caracterizado
189 pelo fato de as lagartas “ignorar” a presença da outra, ficando paradas ou
190 seguindo no sentido em que foram postas. O comportamento “fuga” ocorreu
191 quando a lagarta foi em sentido oposto depois do encontro, geralmente após um

192 ataque sofrido, ou ao comportamento hostil da outra lagarta. “Hostilidade” ocorreu
193 quando a lagarta levantou a região anterior do corpo agitando-a, como um tremor.
194 “Ataque” foi caracterizado quando havia um movimento agressivo na direção da
195 outra, que podia ou não resultar em ferimento. “Canibalismo”, por sua vez,
196 ocorreu quando a lagarta foi atacada e canibalizada. Entre lagartas de 1º e 3º
197 ínstaes foram feitas 15 repetições entre irmãos e 15 repetições entre não-irmãos;
198 o mesmo procedimento foi feito para lagartas de 2º e 4º ínstaes. A frequência de
199 cada categoria comportamental foi somada entre as repetições de irmãos
200 (somando as repetições de lagartas de 1º e 3º ínstar com as de 2º e 4º ínstar,
201 correspondendo portanto a um tamanho amostral de 30) e entre repetições de
202 não-parentes (também somando lagartas de 1º e 3º ínstar com os de 2º e 4º
203 ínstar, N = 30). Os resultados foram tomados em conjunto porque não houve
204 diferença estatística na frequência de canibalismo entre irmãos e não-parentes,
205 em nenhum dos pares de lagartas.

206 Em cada uma das 60 repetições realizadas, a ocorrência dos comportamentos
207 foi somada nas cinco observações, de 10 minutos cada, sendo que em cada uma
208 das observações mais de um comportamento podia ocorrer. O que foi
209 contabilizado foi a ocorrência do comportamento (indiferença, fuga, hostilidade,
210 ataque e canibalismo), independente de este ter sido executado pela lagarta
211 maior ou menor. A análise estatística foi feita através de um teste-G de
212 independência, com correção de Williams.

213

214

215

216 **Resultados**

217

218

219 *O sinal de parentesco tem origem no córion do ovo ou no embrião?*

220

221 A Tabela 1 mostra a frequência de canibalismo quando o ovo meio-irmão
222 paterno eclodia primeiro, em relação aos demais ovos (ver Material e Métodos).
223 As frequências de canibalismo representam a soma do obtido nos sete trios
224 (macho que copulou com duas fêmeas não-aparentadas). Utilizou-se a frequência
225 observada no conjunto dos trios porque a amostra para alguns deles era pequena
226 para uma análise individualizada.

227

228 Tabela 1 – Frequência de canibalismo e não-canibalismo da lagarta meio-irmã
229 paterna com relação aos demais ovos (irmãos entre si), e frequências esperadas
230 de canibalismo para não-parentes e irmãos, segundo De Nardin & Araújo (2011).

Comportamento	Frequência	Esperado para	
	Observada (%)	Não-parentes*	Irmãos*
Canibalizou	36 (83,7%)	83	53
Não canibalizou	7 (16,3%)	17	47
Total	43	100	100

*De Nardin & Araújo (2011), valores em percentagem, para N = 100.

231

232

233 Através dos resultados apresentados, constatamos que a frequência total
234 de canibalismo observada neste experimento não diferiu do esperado para não-
235 parentes (Teste G (Williams): 0,0109; $gl = 1$; $P = 0,9167$). No entanto, houve
236 diferença estatística em relação à frequência de canibalismo observada para
237 irmãos (Teste G (Williams): 12,9255; $gl = 1$; $P = 0,0003$). Isso sugere que lagartas
238 meio-irmãs aparentemente não reconhecem os ovos restantes como parentes, o
239 que indicaria que o sinal para o reconhecimento de parentesco lagarta-ovo estaria
240 no córion do ovo, que tem origem materna.

241

242 *Canibalismo entre lagartas*

243

244 A Tabela 2 mostra os dados das 60 repetições dos testes de canibalismo
245 entre lagartas de 1^o ínstar, por grupo de parentesco. Não houve diferença
246 significativa nas frequências de canibalismo entre lagartas irmãs e não-parentes.

247

248 Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa de canibalismo entre lagartas de
249 primeiro ínstar, irmãs e não-parentes.

Parentesco	Canibalizou (%)	Não canibalizou (%)	N
Irmãs	19 (63,3%)	11 (36,7%)	30
Não-parentes	17 (56,7%)	13 (43,3%)	30

250 Teste G (Williams): 0,2709; $gl = 1$; $P = 0,6027$

251

252 Quanto aos testes com lagartas de diferentes ínstares (1^o x 3^o e 2^o x 4^o),
253 mostrados na Tabela 3, também não houve diferença estatisticamente
254 significativa entre as categorias comportamentais analisadas.

255

256 Tabela 3 – Frequência absoluta de cada categoria comportamental, no total das
257 repetições realizadas, para irmãs e não-parentes, independentemente da
258 comparação entre ínstares.

Parentesco	Indiferença	Fuga	Hostilidade	Ataque	Canibalismo	N
Irmãs	127	63	60	106	4	360*
Não- parentes	134	57	67	113	3	374*

Teste G (Williams): 0,9542; gl = 4; *P* = 0,9167

* Ver Material e Métodos para uma justificativa desses números.

259

260

261 Esses resultados fornecem mais evidências de que as lagartas não tratam
262 parentes diferencialmente, reforçando os indícios de que o sinal de
263 reconhecimento de parentesco está no córion do ovo, como foi mostrado na
264 Tabela 1.

265

266

267 **Discussão**

268

269

270 Embora o único trabalho da literatura, do nosso conhecimento, a indicar
271 que existe reconhecimento de parentesco lagarta-ovo em Lepidoptera seja o de
272 De Nardin & Araújo (2011), os resultados aqui apresentados sugerem que o sinal
273 utilizado para o reconhecimento de parentesco está no córion do ovo. Lagartas de
274 primeiro ínstar não parecem se reconhecer no teste realizado, e as lagartas de
275 ínstars diferentes também não se comportam diferencialmente com relação a
276 parentes. Além disso, a frequência de canibalismo de ovos meio-irmãos paternos
277 não difere da frequência de canibalismo esperada para não-parentes, reforçando
278 a hipótese de que o sinal de reconhecimento está no córion do ovo, já que este
279 tem origem nas células foliculares da mãe.

280 A ocorrência de canibalismo lagarta-ovo é maior do que o canibalismo
281 entre lagartas de ínstars diferentes. Entre lagarta-ovo, o canibalismo foi de pelo
282 menos 50% (De Nardin & Araújo 2011), já entre lagartas de ínstars diferentes, foi
283 ao redor de 12%. Embora a metodologia empregada no teste de canibalismo
284 entre lagartas de primeiro ínstar abranja um tempo bem maior (até que haja morte
285 ou uma das lagartas mude para o segundo ínstar), neste teste a frequência de
286 canibalismo também foi maior que 50%. Isso mostra que as lagartas de primeiro
287 ínstar são bastante agressivas, provavelmente por este ser o estágio mais
288 vulnerável. Tanto os testes de canibalismo lagarta-ovo feitos por De Nardin &
289 Araújo (2011) como o teste de canibalismo entre lagartas de diferentes ínstars
290 executados neste trabalho têm duração de menos de uma hora, sendo assim
291 possível fazer uma comparação da frequência de canibalismo entre eles. Já que o
292 canibalismo de ovos é bem mais frequente do que o canibalismo entre lagartas,
293 isso explica porque o reconhecimento de parentesco só ocorre entre lagarta-ovo,

294 e não entre lagartas. É fato que entre lagartas de primeiro ínstar a frequência de
295 canibalismo também foi alta, mas neste caso o tempo empregado foi bem maior,
296 portanto a frequência de canibalismo não é totalmente comparável aos demais
297 testes. Porém, este teste mostrou a agressividade das lagartas de primeiro ínstar.
298 Há uma grande literatura, em insetos sociais, que emprega ensaios
299 comportamentais de agressividade semelhantes ao teste usado neste estudo
300 (Jutsum et al. 1979; Grangier et al. 2007; Abril & Gómez 2010) alguns inclusive
301 relacionando a agressividade ao reconhecimento (Adams 1991; Errard & Hefetz
302 1997; Stuart & Herbers 2000; Tsutsui et al. 2003; Lalar et al. 2009).

303 Michaud & Grant (2004), que estudaram três espécies de coleópteros,
304 sustentaram que há muitas razões para esperar que o significado adaptativo do
305 canibalismo de ovos em Coccinellidae seja muito diferente do canibalismo larval.
306 Por exemplo, Michaud (2003) demonstrou que o benefício nutricional do
307 canibalismo de ovos é maior do que aquele do canibalismo de larvas, pela criação
308 de larvas de três espécies de coccinélídeos. Em dois casos, a dieta de larvas
309 coespecíficas reduziu significativamente a sobrevivência, e nos três casos o
310 tempo de desenvolvimento total foi aumentado e o peso do adulto reduzido em
311 relação à dieta controle. Em contraste, a dieta de ovos de coespecíficos melhorou
312 a sobrevivência e tempo de desenvolvimento em uma espécie (*Cycloneda*
313 *sanguinea*), com nenhum efeito no tempo de desenvolvimento e apenas uma
314 redução marginal no peso adulto resultante nas outras duas. Essa diferença
315 provavelmente surge porque a proteína contida nos ovos está em estado menos
316 diferenciado do que nas larvas e então é mais eficientemente assimilada. Larvas
317 são capazes de comportamento defensivo ou evasivo, e isso aumenta o risco

318 e/ou o custo do canibalismo larval relativo ao canibalismo de ovos. Assim, é
319 razoável esperar que a rede de benefícios do canibalismo de ovos seja maior do
320 que a rede de benefícios do canibalismo de larvas. Fox (1975) também menciona
321 que a necessidade por proteínas pode ser relacionada ao canibalismo entre
322 herbívoros e granívoros. Supõe-se geralmente que os ovos são altamente
323 nutritivos, já que eles são providos pela mãe com o vitelo para alimentar a larva
324 embriônica em desenvolvimento. Ovos podem, então, ser considerados como
325 fonte alimentar de alta qualidade que se ajusta às necessidades nutricionais dos
326 neonatos melhor do que outras dietas (Eickwort 1973; Michaud & Grant 2004). No
327 caso de *H. erato phyllis* do presente estudo, não se tem estas informações, nem
328 foi feito um acompanhamento dos efeitos do canibalismo de lagartas, mas tendo
329 em vista os resultados encontrados, parece justo considerar algo semelhante.

330 Há alguns trabalhos com outros insetos que abordam a questão de onde
331 está o sinal de reconhecimento de parentesco. Lizé et al. (2006, 2010) mostraram
332 que em *Aleochara bilineata* (um coleóptero parasitóide) um sinal de
333 reconhecimento químico de parentesco está no *plug* feito pela larva de primeiro
334 ínstar para fechar o buraco de entrada no pupário do hospedeiro. Já resultados de
335 Giron & Strand (2004) indicam que larvas conhecidas como “soldados” de
336 *Copidosoma floridanum* distinguem parentes de não-parentes por sua membrana
337 extraembriônica, que é também essencial para defesa contra resposta imune
338 celular do hospedeiro. Lihoreau & Rivault (2009), em trabalho realizado com a
339 barata social *Blattella germanica*, mostraram que o parentesco influencia a
340 escolha de parceiros sociais pelas ninfas. O fato de que as ninfas discriminam
341 irmãos de não-irmãos somente quando tem contato antenal com elas mostra que

342 marcas de discriminação de parentesco não são detectadas à distância, mas são
343 necessariamente percebidas através de contato.

344 Klowden (2007) refere um *imprinting* espécie-específico na superfície
345 interna do córion, o que se acredita que poderia ser extrapolado para um
346 *imprinting* “irmandade-específico”, no caso de *H. erato phyllis*. Em insetos sociais,
347 sistemas de reconhecimento têm sido extensivamente estudados e são
348 tipicamente baseados em marcas químicas (Nehring et al. 2011). Alguns
349 trabalhos sustentam que a discriminação por insetos é geralmente mediada por
350 diferenças nos perfis individuais de hidrocarbonetos cuticulares. Esses compostos
351 protegem os insetos da perda de água e atuam como barreira contra
352 microorganismos. Eles também sinalizam o *status* reprodutivo, fertilidade,
353 qualidade da prole e membros da ninhada. Eles são mais similares entre
354 parceiros de ninhada do que não-parceiros em formigas e abelhas, e
355 presumivelmente funcionam no reconhecimento de parceiros de ninhada. Em
356 adição, sua variabilidade tem sido repetidamente correlacionada com parentesco
357 genético, sugerindo que eles podem codificar informação sobre parentesco e
358 podem funcionar no reconhecimento de parentesco (Soro et al. 2011). Processos
359 de reconhecimento baseados em componentes geneticamente derivados são
360 essenciais para determinar o grau de parentesco para seleção de parentesco
361 (revisado por Breed & Bennett 1987; Dronnet et al. 2006). Além de trabalhos com
362 insetos, Grinsted et al. (2011), em estudo realizado com aranhas sociais
363 *Stegodyphus lineatus*, mostrou que os perfis químicos cuticulares dessas aranhas
364 variam significativamente entre grupos de irmãos, independentemente da idade ou
365 condições de criação. Isso sugere que o perfil de hidrocarbonetos cuticulares

366 carrega informações sobre o parentesco e então pode potencialmente ser usado
367 como marcas de reconhecimento de parentesco. Uma análise detalhada do perfil
368 químico do córion do ovo de *H. erato phyllis* seria necessária para determinar se o
369 sinal de reconhecimento de parentesco no ovo são também os hidrocarbonetos.

370 Os resultados aqui encontrados fornecem evidências de que as lagartas
371 não reconhecem outras lagartas como irmãos biológicos, independente do ínstar.
372 Assim, já que há reconhecimento de parentesco lagarta-ovo, e como as lagartas
373 não reconhecem ovos meio-irmãos paternos como parentes, podemos inferir que
374 o sinal de reconhecimento está no córion do ovo, sendo um sinal de origem
375 materna.

376

377

378 **Agradecimentos**

379

380

381 Somos gratos aos integrantes do laboratório de Genética Ecológica que
382 colaboraram com a criação das borboletas e imaturos durante este estudo. A
383 Rodrigo De Nardin por todo auxílio prestado ao longo deste trabalho. E ao
384 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
385 apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado.

386

387

388 **Referências**

389

390

391 **Abril, S. & Gomez, C.** 2010. Aggressive behaviour of the two European Argentine
392 ant supercolonias (Hymenoptera: Formicidae) towards displaced native ant
393 species of the northeastern Iberian Peninsula. *Myrmecological News*, **14**, 99-
394 106.

395 **Adams, E. S.** 1991. Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite
396 *Microcerotermes arboreus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
397 *of the United States of America*, **88**, 2031-2034.

398 **Breed M. D. & Bennett B.** 1987. Kin recognition in highly eusocial insects. In: *Kin*
399 *Recognition in Animals*. (Ed. por D.J.C. Fletcher & C.D. Michener), pp. 243-
400 285. Chichester: Wiley.

401 **Dell’Erba R., Kaminski L. A. & Moreira G. R. P.** 2005. O estágio de ovo dos
402 Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*
403 *Zoologia*, **95**, 29-46.

404 **De Nardin J. & Araújo A. M.** 2011. Kin recognition in immatures of *Heliconius*
405 *erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Journal of Ethology*, **29**, 499–503.

406 **Dronnet S., Lohou C., Christides J. P. & Bagnères A. G.** 2006. Cuticular
407 hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the
408 introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *Journal of Chemical*
409 *Ecology*, **32**, 1027–1042

410 **Drummond III B.A.** 1984. Multiple mating and sperm competition in the
411 Lepidoptera. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating*
412 *Systems*. (Ed. por R. L. Smith), pp. 291-370. London: Academic Press.

- 413 **Dudley S.A. & File A. L.** 2007. Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters*,
414 **3**, 435-438.
- 415 **Eickwort K. R.** 1973. Cannibalism and kin selection in *Labidomera clivivollis*
416 (Coleoptera: Chrysomelidae). *American Naturalist*, **107**, 452-453.
- 417 **Errard C. & Hefetz A.** 1997. Label familiarity and discriminatory ability of ants
418 reared in mixed groups. *Insectes Sociaux*, **44**, 189-198.
- 419 **Fox L. R.** 1975. Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology*
420 and Systematics, **6**, 87-106
- 421 **Giron D. & Strand M. R.** 2004. Host resistance and the evolution of kin
422 recognition in polyembryonic wasps. *Proceedings of the Royal Society B*
423 (Suppl), **27**, S395–S398.
- 424 **Grangier J., Le Breton J., Dejean A. & Horrible J.** 2007. Coexistence between
425 *Cyphomyrmex* ants and dominant populations of *Wasmannia auropunctata*.
426 *Behavioural Processes*, **74**, 93-96.
- 427 **Green W. W., Mirza R. S. & Pyle G. G.** 2008. Kin recognition and cannibalistic
428 behaviours by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*).
429 *Naturwissenschaften*, **95**, 269-272.
- 430 **Grinsted L., Bilde T. & d’Ettorre P.** 2011. Cuticular hydrocarbons as potential kin
431 recognition cues in a subsocial spider. *Behavioral Ecology*, doi:
432 [10.1093/beheco/arr105](https://doi.org/10.1093/beheco/arr105).
- 433 **Hamilton W. D.** 1964. The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of*
434 *Theoretical Biology*, **7**, 1-16.
- 435 **Holmes W. G.** 2004. The early history of Hamiltonian based research on kin
436 recognition. *Annales Zoologici Fennici*, **41**, 691-711.

- 437 **Howard R. & Blomquist G. J.** 2005. Ecological, behavioural, and biochemical
438 aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, **50**, 371–393.
- 439 **Jutsum, A. R., Saunders, T. S. & Cherrett, J. M.** 1979. Intraspecific aggression
440 is the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour*, **27**, 839-
441 844.
- 442 **Klowden M. J.** 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2nd ed. Moscow:
443 Academic Press.
- 444 **Kruczek M.** 2007. Recognition of kin in bank voles (*Clethrionomys glareolus*).
445 *Physiology e Behavior*, **90**, 483–489.
- 446 **Lalzar I., Simon T., Vander Meer R. K. & Hefetz A.** 2009. Alteration of cuticular
447 hydrocarbon composition affects heterospecific nestmate recognition in the
448 carpenter ant *Camponotus fellah*. *Chemoecology*, **20**,19-24.
- 449 **Lihoreau M. & Rivault C.** 2009. Kin recognition via cuticular hydrocarbons shapes
450 cockroach social life. *Behavioral Ecology*, **20**, 46-53.
- 451 **Lizé A., Carval D., Cortesero A. M., Fournet S. & Poinso D.** 2006. Kin
452 discrimination and altruism in the larvae of a solitary insect. *Proceedings of the*
453 *Royal Society B*, **273**, 2381-2386
- 454 **Lizé A., Cortesero A. M., Bagnères A. G. & Poinso D.** 2010. Kin recognition in
455 the larvae of a solitary insect: the cue is in the plug. *Behavioral Ecology*,
456 **21**,633-638.
- 457 **Mateo J. M.** 2004. Recognition systems and biological organization: the
458 perception component of social recognition. *Annales Zoologici Fennici*, **41**,
459 729-745.

- 460 **Mehdiabadi N. J., Jack C. N., Farnham T. T., Platt T. G., Kalla S. E., Shaulsky**
461 **G., Queller D. C. & Strassmann J. E.** 2006. Kin preference in a social
462 microbe. *Nature*, **442**, 881-882.
- 463 **Mehdiabadi N. J., Kronforst M. R., Queller D. C. & Strassmann J. E.** 2008.
464 Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba
465 *Dictyostelium purpureum*. *Evolution*, **63**, 542–548.
- 466 **Mehlis M., Bakker T. C. M., Engqvist L. & Frommen J. G.** 2010. To eat or not to
467 eat: egg-based assessment of paternity triggers fine-tuned decisions about
468 filial cannibalism. *Proceedings of the Royal Society B*, **277**, 2627-2635.
- 469 **Michaud J. P.** 2003. A comparative study of larval cannibalism in three species of
470 ladybird. *Ecological Entomology*, **28**, 92-101.
- 471 **Michaud J. P. & Grant A. K.** 2004. Adaptive significance of sibling egg
472 cannibalism in Coccinellidae: comparative evidence from three species.
473 *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 710-719.
- 474 **Moore J.** 2007. Perspective: Phenotype matching and inbreeding avoidance in
475 African elephants. *Molecular Ecology*, **16**, 4421-4423.
- 476 **Nehring V., Evison S. E. F., Santorelli L. A., d’Ettorre P. & Hughes W. H. O.**
477 2011. Kin-informative recognition cues in ants. *Proceedings of the Royal*
478 *Society B*, **278**: 1942-1948.
- 479 **Ostrowski E. A., Katoh M., Shaulsky G., Queller D. C. & Strassmann J.E.**
480 2008. Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba.
481 *PLoS Biology*, **6**, 2376-2382.
- 482 **Patterson L., Dick J. T. A. & Elwood R. W.** 2008. Embryo retrieval and kin
483 recognition in an amphipod (Crustacea). *Animal Behaviour*, **76**, 717-722.

- 484 **Schneider J. M. & Bilde T.** 2008. Benefits of cooperation with genetic kin in a
485 subsocial spider. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
486 *United States of America*, **105**, 10843-10846.
- 487 **Sharp S. P., McGowan A., Wood M. J. & Hatchwell B. J.** 2005. Learned kin
488 recognition cues in a social bird. *Nature* **434**, 1127-1130.
- 489 **Sherborne A. L., Thom M. D., Paterson S., Jury F., Ollier W. E. R., Stockley P.,**
490 **Beynon R. J. & Hurst J. L.** 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance
491 in house mice. *Current Biology*, **17**, 2061–2066.
- 492 **Soro A., Ayasse M., Zobel M. U. & Paxton R. J.** 2011. Kin discriminators in the
493 eusocial sweat bee *Lasioglossum malachurum*: the reliability of cuticular and
494 Dufour's gland odours. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 641–653.
- 495 **Stuart R.J. & Herbers J. M.** 2000. Nest mate recognition in ants with complex
496 colonies: within- and between-population variation. *Behavioral Ecology*, **11**,
497 676-685.
- 498 **Telfer W. H.** 2009. Egg formation in Lepidoptera. *Journal of Insect Science*, **9**, 1-
499 21.
- 500 **Tsutsui N. D., Suarez A. V. & Grosberg R. K.** 2003. Genetic diversity,
501 asymmetrical aggression, and recognition in a widespread invasive species.
502 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
503 *America*, **100**, 1078-1083.
- 504

CAPÍTULO 4

Genes para canibalismo ou para reconhecimento de parentesco? Estudos adicionais dos efeitos do endocruzamento em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae).

(Artigo em preparação)

Redigido segundo as normas da revista *Genetics and Molecular Biology*.

As tabelas estão junto aos resultados, e não nas últimas páginas, como seria o formato para submissão, para facilitar a leitura do artigo.

1 **Genes para canibalismo ou para reconhecimento de parentesco? Estudos**
2 **adicionais dos efeitos do endocruzamento em *Heliconius erato phyllis***
3 **(Lepidoptera; Nymphalidae).**

4
5 Janaína De Nardin ^{1,2} e Aldo Mellender de Araújo ^{1,2}

6
7 ¹ Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de
8 Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS,
9 Brasil.

10 ² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade
11 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

12
13 Palavras-chave: heliconíneo, lagartas canibais e não-canibais, herança do
14 reconhecimento de parentesco, endocruzamento

15
16
17 Correspondência – Janaína De Nardin:

18
19 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av.
20 Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 215. CEP: 91501-970. Cx. Postal
21 15053, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6732 Fax: +55 51 3316-7311.

22 E-mail: janaina.dn@gmail.com

23

24 **Resumo**

25

26

27 As lagartas recém-eclodidas de *Heliconius erato phyllis* podem ser canibais e
28 reconhecer irmãos biológicos, canibalizando preferencialmente os ovos não-
29 parentes. O objetivo deste trabalho foi, através de cruzamentos entre indivíduos
30 canibais e entre indivíduos não-canibais, analisar a prole com diferentes
31 coeficientes de endocruzamento ($F = 0$ e $F = 0,25$), e fazer inferências sobre o
32 modo de herança do reconhecimento de parentesco (e canibalismo) nesta
33 espécie. Lagartas canibais e não-canibais foram criadas até a fase adulta, quando
34 foram feitos cruzamentos entre canibais irmãos, entre canibais não-parentes,
35 entre não-canibais irmãos e entre não-canibais não-parentes. A prole dos
36 cruzamentos foi submetida a testes de canibalismo e a frequência do
37 comportamento canibal para cada uma das proles foi estimada. Os resultados
38 mostraram que, para $F = 0,25$, houve uma frequência elevada de não-canibais
39 ($> 70\%$). Já para $F = 0$, a frequência de lagartas canibais foi alta ($> 50\%$). Esses
40 resultados sugerem que o reconhecimento de parentesco tem um forte
41 componente genético, enquanto que o canibalismo parece ser principalmente
42 devido à ausência ou a poucos genes para reconhecimento. Os indivíduos com os
43 diferentes coeficientes de endocruzamento tiveram a ontogenia acompanhada,
44 com o objetivo de verificar as consequências do endocruzamento na ontogenia de
45 *H. erato phyllis*. As variáveis analisadas foram peso e volume do ovo, duração dos
46 ínstar e pupa, tempo total da eclosão até o adulto, taxa de crescimento, peso
47 da pupa, área das asas e mortalidade de imaturos. Houve diferenças

48 estatisticamente significativas entre o grupo não-endocruzado e endocruzado
49 para peso da pupa e área das asas (endocruzados < não-endocruzados) e para
50 mortalidade de imaturos (endocruzados > não-endocruzados), mostrando que
51 nesta espécie há uma depressão pelo endocruzamento.

52

53

54 **Introdução**

55

56

57 O parentesco tem sido considerado um fator importante na transição de
58 células individuais para organismos multicelulares, e da individualidade para a
59 cooperação em grupos sociais (Maynard Smith e Szathmáry, 1995). Sistemas de
60 reconhecimento de parentesco baseados na genética são aqueles nos quais os
61 alelos são expressos como marcas identificáveis (odores, estruturas morfológicas,
62 etc.). Supõe-se que cada indivíduo pode perceber um número de marcas que ele
63 compartilha com outro, e pode utilizar essa informação para tomar uma decisão
64 quanto ao grau pelo qual ele se relaciona com o outro (Getz, 1981). A
65 discriminação de parentes com base na genética tem sido encontrada em
66 diversos grupos de organismos marinhos coloniais (Crozier, 1986; Grosberg e
67 Quinn, 1986). Camundongos também contam com genes de histocompatibilidade
68 (MHC) para a cooperação (Manning *et al.*, 1992) e para evitar o endocruzamento
69 (Potts *et al.*, 1991). Larvas canibais da salamandra tigre *Ambystoma tigrinum*
70 usam sinais olfatórios “parente-específicos” com base genética para se
71 alimentarem de não-parentes, mas evitam comer parentes, diferenciando até

72 mesmo primos (Pfennig *et al.*, 1994). Componentes genéticos de reconhecimento
73 também têm sido encontrados em artrópodes, como isópodes subsociais
74 (Linsenmair, 1987), coccinelídeos (Joseph *et al.*, 1999), em abelhas eusociais
75 (Greenberg, 1979; Moritz e Hillesheim, 1990), formigas (Beye *et al.*, 1998; Tsutsui
76 *et al.*, 2000) e cupins (Adams, 1991).

77 Entretanto, componentes ambientais de reconhecimento de colônia têm
78 sido evidenciados em muitas espécies sociais, incluindo formigas, vespas e
79 abelhas. Os ratos toupeira eusociais, *Heterocephalus glaber*, também usam
80 marcas ambientais para discriminar membros da colônia daqueles das colônias
81 vizinhas. Em humanos, a discriminação pode ocorrer com base em características
82 culturais, que são puramente ambientais (Lehmann e Perrin, 2002).

83 Sistemas de reconhecimento de parentesco são muitas vezes específicos e
84 regulados por um ou mais locos polimórficos (Crozier, 1986; Grosberg e Quinn,
85 1986). Os fatores de manutenção desses polimorfismos em insetos sociais são
86 em grande parte desconhecidos, embora estudos com organismos marinhos
87 coloniais sugere papéis para seleção indireta via escolha de parceiro ou seleção
88 direta para resistência a patógenos, ou o parasitismo da linhagem germinativa ou
89 ainda competição intraespecífica (Giron e Strand, 2004). Segundo Grafen (1990),
90 a evolução de um verdadeiro sistema de reconhecimento depende de três tipos
91 de locos: correspondência, detecção e uso (*matching, detecting e using*). O loco
92 de correspondência afetaria as marcas usadas para detectar parentes, sendo que
93 o polimorfismo nesses locos seria essencial para detectar parentes. O loco de
94 detecção controlaria se a similaridade no loco de correspondência é detectada ou

95 não. Já o loco de uso controlaria como a informação sobre a correspondência é
96 usada.

97 Há vários trabalhos que encontraram evidências de reconhecimento de
98 parentesco através do canibalismo diferencial de parentes e não-parentes, alguns
99 deles em insetos (Nummelin, 1989; Dickinson, 1992; Agarwala e Dixon, 1993;
100 Joseph *et al.*, 1999; De Nardin e Araújo, 2011). Em alguns insetos, a
101 probabilidade de canibalizar pode ser influenciada pela predisposição genética ou
102 fenotípica para canibalizar (Englert e Thomas, 1970; Gould *et al.*, 1980; Richter,
103 1986; Tarpley *et al.*, 1993). O canibalismo pode ser influenciado também por
104 fatores densidade-dependentes, e outros fatores densidade-independentes, além
105 da predisposição genética, como condições ambientais abióticas, assincronia com
106 a planta hospedeira (ex. quando neonatos eclodem antes das plantas
107 hospedeiras estarem disponíveis), pobre qualidade nutricional da planta
108 hospedeira, assincronia no desenvolvimento dentro das populações e
109 disponibilidade de coespecíficos vulneráveis devido à doença, parasitismo, injúria
110 ou muda (Richardson *et al.*, 2010, e referências lá citadas).

111 Nas borboletas do gênero *Heliconius* há informações esparsas sobre a
112 ocorrência de canibalismo e para uma grande quantidade de espécies
113 simplesmente nada há sobre este comportamento. Uma notável exceção é
114 *Heliconius erato phyllis*, cujas lagartas recém-eclodidas reconhecem irmãos
115 biológicos, canibalizando preferencialmente os ovos não-parentes quando há
116 escolha (De Nardin e Araújo, 2011). Entretanto, não há estudos que tratem da
117 genética do reconhecimento de parentesco nesta espécie. Dessa forma, o
118 objetivo deste trabalho foi, através de cruzamentos entre indivíduos canibais e

119 entre indivíduos não-canibais, analisar a prole com diferentes coeficientes de
120 endocruzamento ($F = 0$ e $F = 0,25$), e tentar fazer inferências sobre o modo de
121 herança do reconhecimento de parentesco (e canibalismo) nesta espécie. As
122 lagartas canibais foram consideradas como egoístas, que não tratam parentes
123 diferencialmente; já lagartas não-canibais foram consideradas como altruístas,
124 que reconhecem parentes, evitando canibalizá-los (em trabalho anterior foram
125 estimados os custos e benefícios respectivos; De Nardin e Araújo, submetido).
126 Além disso, a ontogenia das lagartas canibais e não-canibais resultantes dos
127 cruzamentos, bem como dos ovos restantes, foi acompanhada, a fim de verificar
128 se existem diferenças no desenvolvimento entre os indivíduos com diferentes
129 coeficientes de endocruzamento. O endocruzamento pode levar a depressão
130 endogâmica, que consiste na redução da capacidade reprodutiva, no decréscimo
131 da sobrevivência, manifestando-se também na expressão de fenótipos
132 qualitativos e quantitativos (Frankham *et al.*, 2008).

133

134

135 **Material e Métodos**

136

137

138 Fêmeas de *Heliconius erato phyllis*, oriundas da natureza, de diferentes
139 populações, foram criadas em viveiros com cerca de 2 m x 2 m x 3 m, em área
140 adjacente ao Departamento de Genética da UFRGS (Porto Alegre, Rio Grande do
141 Sul, Brasil) (30°04'31''S; 51°07'00''W), cujo interior é composto de muitas plantas
142 para simular as condições naturais, incluindo *Passiflora misera*, *P. suberosa* e *P.*

143 *capsularis*, plantas em que as fêmeas de *H. erato phyllis* ovipositam, e das quais
144 as lagartas se alimentam. A alimentação das borboletas foi feita diariamente,
145 através de pequenos recipientes contendo uma mistura de água, mel e pólen.

146 Os ovos, coletados diariamente, foram dispostos nos vértices de um
147 triângulo equilátero (feito de papel cartolina, verde) de 0,5 cm de lado. Em cada
148 teste foram utilizados apenas ovos provenientes da mesma fêmea, isto é, irmãos.
149 Como as fêmeas são monândricas (Garcias, 1983; Drummond III, 1984), há a
150 certeza de que ovos provenientes de uma mesma fêmea são irmãos completos.
151 Os triângulos foram mantidos em placas de Petri, com diâmetro de 8 cm e altura
152 de 1,5 cm, em temperatura ambiente, sobre um papel toalha levemente
153 umedecido para evitar a desidratação dos ovos. Após a emergência de uma
154 lagarta foi verificada a ocorrência ou não do canibalismo desta em relação aos
155 ovos restantes, durante o tempo de 45 minutos. A partir de então, os indivíduos
156 canibais e não-canibais foram identificados por um número e o código C ou NC,
157 respectivamente. Essas lagartas foram criadas até a fase adulta, quando foram
158 feitos cruzamentos entre irmãos canibais ($r = 0,5$) (N = duas proles, F = 0,25),
159 entre canibais não-parentes ($r = 0$) (N = três proles, F = 0), entre irmãos não-
160 canibais ($r = 0,5$) (N = duas proles, F = 0,25) e entre não-canibais não-parentes
161 ($r = 0$) (N = duas proles, F = 0) (Tabela 1).

162 As fêmeas fecundadas foram mantidas isoladas, e seus ovos coletados
163 diariamente. Estes foram pesados e o volume de cada um foi estimado. A
164 pesagem foi feita em uma balança BOSCH-Wägesysteme GmbH D-72417, com
165 precisão de 0,0001 g. Foram realizadas três pesagens sucessivas do mesmo ovo,

166 e feita a média do peso de cada ovo. A determinação do volume foi feita através
167 da fórmula do volume do esferóide (Rashidi *et al.*, 2008):

168
$$V_{\text{esferóide}} = \pi \frac{LD^2}{6}$$

169 onde L é o comprimento do ovo da base ao ápice, e D é o diâmetro máximo do
170 ovo. Tais medidas foram obtidas com o auxílio de microscópio estereoscópio
171 binocular, marca Nikon, modelo SMZ645.

172 A prole dos cruzamentos foi submetida a testes de canibalismo como o
173 descrito acima, e assim a frequência de canibalismo para cada uma das proles foi
174 estimada. Os indivíduos com os diferentes coeficientes de endocruzamento (F = 0
175 e F = 0,25) tiveram a ontogenia acompanhada. Aqui, o objetivo foi verificar as
176 consequências do endocruzamento na ontogenia de *H. erato phyllis* e compará-
177 las com estimativas dos efeitos do endocruzamento em trabalho anterior (Di Mare
178 e Araújo, 1986), onde outras variáveis foram analisadas.

179 As lagartas foram acondicionadas individualmente em potes plásticos,
180 translúcidos, com tampa branca (8,5 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro). O fundo
181 do pote foi coberto com papel absorvente branco, para reter a umidade. As
182 lagartas tiveram todo o desenvolvimento acompanhado, e todas receberam
183 tratamento igual, sendo mantidas a 25°C e alimentadas diariamente, *ad libitum*,
184 apenas com folhas de *Passiflora suberosa*.

185 As variáveis analisadas foram peso do ovo, volume do ovo, tempo de
186 duração de cada estágio larval, tempo total de duração do período pré-adulto,
187 taxa de crescimento (R), peso da pupa, área das asas anteriores direita e
188 esquerda, e asas posteriores direita e esquerda. Foi executada uma análise da
189 variância de um critério para comparar indivíduos com F = 0 (N = 50) e F = 0,25

190 (N = 40), através do programa SPSS 15.0, depois das transformações estatísticas
191 necessárias (ver Tabela 2). A mortalidade durante o desenvolvimento também foi
192 analisada, através de teste G de contingência com correção de Williams, pelo
193 programa BioEstat 5.0 (<http://www.mamiraua.org.br/download/>).

194 As pupas foram pesadas no dia seguinte a sua formação. A taxa de
195 crescimento foi calculada através da fórmula obtida de Smiley (1978), onde *dias*
196 corresponde aos dias da eclosão até a formação da pupa:

$$R = \frac{\left(\frac{\text{peso da pupa}}{\text{peso do ovo}} \right)^{\frac{1}{5}} - 1}{\frac{\text{dias}}{5}}$$

198 A área das asas dos adultos foi calculada através do programa ImageJ 1.37v.
199 (Wayne Rasband NIH, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

200

201

202 **Resultados**

203

204

205 A tabela 1 mostra os resultados obtidos nos cruzamentos realizados entre
206 canibais irmãos (F = 0,25) e não-parentes (F = 0), e entre não-canibais irmãos e
207 não-parentes.

208

209

210

211

212 Tabela 1 - Frequência de canibalismo em nove proles, resultantes de cruzamento
 213 entre pais canibais (C), e entre pais não-canibais (NC) conforme o grau de
 214 parentesco (F).

Proles	F	N	Comportamento dos pais		Comportamento da prole (%)	
			♂	♀	C	NC
1	0,25	15	C	C	13,3	86,7
2	0,25	3	C	C	0	100
3	0,25	18	NC	NC	22,2	77,8
4	0,25	14	NC	NC	28,6	71,4
5	0	16	C	C	75	25
6	0	6	C	C	66,7	33,3
7	0	3	C	C	66,7	33,3
8	0	22	NC	NC	59,1	40,9
9	0	14	NC	NC	85,7	14,3

215

216

217 De um modo geral, independentemente dos tamanhos das irmandades e
 218 do comportamento parental, percebe-se que para $F = 0,25$, houve uma frequência
 219 elevada de não-canibais, sempre acima de 70%, mesmo que os pais tenham sido
 220 canibais. Por outro lado, para $F = 0$, a frequência de lagartas canibais foi alta,
 221 sempre acima de 50%.

222 Os resultados obtidos a partir dos cruzamentos realizados na Tabela 1 não
223 se mostraram compatíveis com um modo de herança monogênica simples.

224 A análise da ontogenia através da análise da variância revelou diferenças
225 estatisticamente significativas entre o grupo não-endocruzado e endocruzado
226 para peso da pupa ($P = 0,006$) e para área das asas anteriores (direita: $P < 0,001$
227 e esquerda: $P = 0,004$) e posteriores (direita: $P < 0,001$ e esquerda: $P < 0,001$).
228 Como foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre as asas
229 anteriores direita e esquerda ($r = 0,917$; $P = 0,01$) e entre as asas posteriores
230 direita e esquerda ($r = 0,979$; $P = 0,01$), na Tabela 2, apenas a média \pm desvio-
231 padrão da área da asa anterior direita está representada. Para as demais
232 variáveis analisadas (peso do ovo, volume do ovo, tempo de duração de cada
233 estágio larval, tempo total de duração do período pré-adulto, taxa de crescimento)
234 não houve diferença estatisticamente significativa.

235

236 Tabela 2 – Efeitos do endocruzamento para variáveis da ontogenia de *Heliconius*
237 *erato phyllis* (média \pm desvio-padrão, que estão nas unidades originais). P é o
238 resultado das comparações pela ANOVA, em cada coluna, após as
239 transformações utilizadas para cada variável.

Coeficiente de endocruzamento (F)	Volume do ovo (mm ³) ¹	Peso do ovo (mg) ¹	Duração de cada estágio pré-adulto (dias) ²						Dias da eclosão até fase adulta ²	Taxa de crescimento (R)	Peso da pupa (g) ¹	Área da asa anterior (mm ²) ³	N
			L1	L2	L3	L4	L5	Pupa					
0	0,6015	0,6312	3,20	2,12	2,31	3,02	4,50	8,04	23,14	0,8852	0,3684	452,08	50
	± 0,0587	± 0,0796	± 1,06	± 0,63	± 0,97	± 1,26	± 1,07	± 0,83	± 3,16	± 0,1598	± 0,0590	± 58,85	
0,25	0,6027	0,6206	3,34	1,87	2,22	3,11	4,79	7,97	22,73	0,8757	0,3328	402,26	40
	± 0,0543	± 0,0687	± 0,97	± 0,62	± 0,98	± 1,10	± 1,44	± 0,63	± 3,69	± 0,2019	± 0,0599	± 46,57	
<i>P</i>	0,907	0,527	0,494	0,073	0,394	0,647	0,410	0,717	0,460	0,811	0,006	0,000	–

¹ Transformação raiz cúbica.

² Transformação log base 10.

³ Transformação raiz quadrada.

240

241

242 A mortalidade ao longo do desenvolvimento também resultou em diferença
 243 estatisticamente significativa entre os grupos com os dois diferentes coeficientes
 244 de endocruzamento (Teste-G (Williams): 5,9953; P = 0,0143), sendo que a
 245 mortalidade do grupo endocruzado foi de 45,20%, e do grupo não-endocruzado
 246 foi de 25,37%.

247

248

249 **Discussão**

250

251

252 Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o reconhecimento de
 253 parentesco tem um forte componente genético, particularmente de um sistema
 254 poligênico para genes de pequeno efeito, ou eventualmente para dois ou mais
 255 locos, enquanto que o canibalismo parece ser principalmente devido à ausência
 256 ou a poucos genes para reconhecimento; a possibilidade de um efeito limiar para
 257 o reconhecimento não pode ser descartada nestes casos. É importante destacar,

258 em relação ao objetivo principal deste trabalho, que nos casos de $F = 0,25$ cujos
259 pais eram canibais, seus descendentes tiveram em média, aproximadamente
260 89,2% de não-canibais, o que sugere que, pelo fato de serem endocruzados, os
261 irmãos tendem a se reconhecer (via genes específicos, tornados homozigotos,
262 presumivelmente) e a não canibalizar. Quando os pais eram não-canibais, para
263 $F = 0,25$, a frequência na irmandade foi cerca de 75% de não-canibais. Estes
264 achados nos levaram a postular a existência de genes para reconhecimento de
265 parentesco. Um dos modelos mais interessantes sobre a existência de genes de
266 reconhecimento foi proposto por Rousset e Roze (2007), que postularam a
267 existência de dois locos, ligados ou não, um para a correspondência e o outro
268 para ajuda. O modelo destes autores apresenta algumas particularidades que o
269 tornam candidato a ser testado em *H. erato phyllis*: i) Os organismos são
270 haplóides (no caso atual, a informação estaria no córion do ovo, de origem
271 materna, e independente da fecundação para o seu funcionamento); ii) As
272 populações seriam estruturadas espacialmente, com baixo fluxo gênico (muito
273 similar ao que parece ocorrer com *H. erato phyllis*); iii) Um dos casos examinados
274 prevê seleção fraca e manutenção dos polimorfismos dos locos em questão (em
275 outro trabalho, mostrou-se que os coeficientes de seleção para altruísta e egoísta
276 seriam baixos; De Nardin e Araújo, submetido).

277 Além da influência do endocruzamento na frequência de canibalismo, este
278 também tem efeitos no peso da pupa e no tamanho dos adultos (é possível que
279 este último seja consequência do anterior). Segundo Michaud e Grant (2004), um
280 tamanho maior do adulto significa maior potencial de fecundidade para fêmeas e

281 várias vantagens potenciais de sobrevivência associadas com reservas
282 energéticas maiores.

283 Um dado interessante é que o tamanho dos ovos (peso e volume) não
284 difere entre indivíduos endocruzados e não-endocruzados. De Nardin e Araújo
285 (submetido) encontraram que o tamanho de ovos que dão origem a lagartas não-
286 canibais é menor do que os ovos que dão origem a lagartas canibais, a partir de
287 fêmeas fecundadas da natureza, ou como resultado de cruzamentos em viveiros,
288 mas não endocruzados. Mas aqui, embora a frequência de lagartas não-canibais
289 entre os indivíduos endocruzados seja grande, os ovos de uma forma geral não
290 são menores. Esta questão parece ser importante e sugere a existência de algum
291 controle das fêmeas da natureza, especialmente, quanto ao tamanho dos ovos
292 que produzem como resposta às condições ambientais; esta especulação, no
293 entanto, requer mais dados empíricos e experimentação.

294 A arquitetura genética das marcas de reconhecimento varia bastante entre
295 diferentes grupos sociais, de sistemas de reconhecimento baseados em alelos
296 (por exemplo fungos, invertebrados marinhos, micetozoários), no efeito de
297 proteínas urinárias e locos MHC e no *background* genético dos odores de
298 reconhecimento em mamíferos, e em insetos sociais onde efeitos genéticos
299 indiretos provavelmente desempenham um papel importante (Helanterä *et al.*,
300 2011).

301 O reconhecimento de parentesco foi bastante estudado em insetos sociais,
302 onde comumente conta com quimiorrecepção associada a hidrocarbonetos
303 epicuticulares (Howard e Blomquist, 2005; Lizé *et al.*, 2010). Nehring *et al.* (2011)
304 mostraram que a informação codificada nos perfis cuticulares é um polimorfismo

305 genético e não apenas variação aleatória que poderia ser usada para qualquer
306 tipo de discriminação. Esses autores mostraram que substâncias cuticulares são
307 herdáveis, e que em colônias de *Acromyrmex octopinosus* os operários têm a
308 informação disponível para potencialmente discriminar irmãos-completos de meio-
309 irmãos e então possivelmente atuar nepotisticamente.

310 Em *Heliconius erato phyllis*, há evidências de que o sinal de
311 reconhecimento de parentesco está no córion do ovo (De Nardin *et al.*, em
312 preparação), mas ainda não há informações sobre as marcas utilizadas, e nem
313 sobre os genes envolvidos na produção e reconhecimento dessas marcas. Como
314 consequência de uma menor quantidade de genes para reconhecimento, o
315 fenótipo canibal se expressaria. Além disso, a informação de que o canibalismo
316 parece ter um forte componente ambiental reforça a ideia de que este
317 comportamento pode ter evoluído devido à competição por recursos, não por (ou
318 não apenas por) uma predisposição genética ou por grandes vantagens ao longo
319 do desenvolvimento (De Nardin e Araújo, submetido).

320 Há provavelmente muitos genes envolvidos no reconhecimento de
321 parentesco, sendo possível que seja necessário que um perfil limiar de marcas de
322 reconhecimento seja atingido para que haja reconhecimento. Sob condições de
323 endocruzamento, a prole terá uma probabilidade maior de que os genes que
324 codificam essas marcas estejam em homozigose, e o limiar para expressão do
325 reconhecimento é mais facilmente atingido. Nos cruzamentos de canibais não-
326 aparentados (proles 5, 6 e 7 na Tabela 1), a frequência de canibalismo foi de pelo
327 menos 66%, o que poderia sugerir uma predisposição genética para canibalizar.
328 Entretanto, os cruzamentos de números 8 e 9 (Tabela 1), que foram realizados

329 entre não-canibais não-aparentados resultaram em uma frequência de
330 canibalismo maior até do que o encontrado para cruzamentos de canibais
331 aparentados, sugerindo que se trata de um sistema genético complexo.

332 Di Mare e Araújo (1986) estimaram os efeitos do endocruzamento em
333 *Heliconius erato phyllis* através de 14 cruzamentos feitos em insetário, e
334 constataram que a proporção de ovos eclodidos e a sobrevivência de ovo a adulto
335 foram reduzidas significativamente de cerca de 10% para cada aumento de 10%
336 no coeficiente de endocruzamento. O tempo de desenvolvimento também foi
337 diferente entre os grupos endocruzados e controles, embora fosse igual entre o
338 grupo endocruzado. Estimativas de endocruzamento em populações naturais
339 dessa borboleta mostram um alto grau de parentesco entre os indivíduos de uma
340 população (Di Mare e Araújo, 1986; Silva e Araújo, 1994). Haag e Araújo (1994),
341 em estudo com *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae), analisaram 10 progênes,
342 com diferentes valores de F, do ovo até o adulto, e constataram que, geralmente,
343 há um incremento na taxa de não-eclosão e inviabilidade dos ovos, à medida que
344 o grau de endocruzamento aumenta. Esse estudo encontrou também que as asas
345 de machos são maiores que as das fêmeas, mas que o comprimento das asas
346 não é diretamente influenciado pelo endocruzamento e origem da amostra.

347 Há evidências de que existem genes para o reconhecimento de
348 parentesco, mas mais estudos são necessários a fim de elucidar a questão de
349 quais são os genes que codificam as marcas que são utilizadas para reconhecer
350 parentes, quais genes são responsáveis pelo tratamento diferencial dado a
351 parentes, e esclarecer também se o comportamento canibal seria reflexo de

352 poucos de tais genes ou seria ambiental. No entanto, a hipótese de herança
353 específica para o canibalismo pode ser passível de teste experimental.

354

355

356 **Agradecimentos**

357

358

359 Agradecemos aos colegas do laboratório de Genética Ecológica da UFRGS
360 pela ajuda na criação dos imaturos e adultos de *Heliconius erato phyllis*,
361 especialmente à Camila Horbach pelo auxílio no preparo das lâminas para análise
362 do tamanho das asas; ao grupo de Genética Vegetal da UFRGS pelo empréstimo
363 da balança analítica; a Rodrigo De Nardin por todo auxílio prestado ao longo
364 deste trabalho; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
365 Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado.

366

367

368 **Referências**

369

370

371 Adams ES (1991) Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite
372 *Microcerotermes arboreus*. Proc Natl Acad Sci USA 88:2031-2034.

373 Agarwala BK e Dixon AFG (1993) Kin recognition: egg larval cannibalism in *Adalia*
374 *bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur J Entomol 90:45-50.

375 Beye M, Neumann P, Chapuisat M, Pamilo P e Moritz RFA (1998) Nestmate
376 recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*.
377 Behav Ecol Sociobiol 43:67–72.

378 Crozier RH (1986) Genetic clonal recognition abilities in marine invertebrates must
379 be maintained by selection for something else. Evolution 40:1100–1101.

380 De Nardin J e Araújo AM (2011) Kin recognition in immatures of *Heliconius erato*
381 *phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). J Ethol 29:499–503.

382 Di Mare RA e Araújo AM (1986) A first survey of inbreeding effects in *Heliconius*
383 *erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). Rev Bras Genet 9:11-20.

384 Dickinson JL (1992) Egg cannibalism by larvae and adults of the milkweed leaf
385 beetle (*Labidomera clivicollis*, Coleoptera: Chrysomelidae). Ecol Entomol
386 17:209–218.

387 Drummond III BA (1984) Multiple mating and sperm competition in the
388 Lepidoptera. In: Smith RL, editor. Sperm Competition and the Evolution of
389 Animal Mating Systems. London: Academic Press, Inc, p. 291-370.

390 Englert DC e Thomas WH (1970) The influence of the homeotic mutation,
391 “antennapedia,” on egg cannibalism in *Tribolium castaneum*. Trans Ill State
392 Acad Sci 63:51–56.

393 Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da
394 Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280p.

395 Garcias GL (1983) Aspectos da biologia populacional de cinco espécies de
396 heliconíneos do anel mimético “laranja” (Lepidoptera, Nymphalidae).
397 Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Rio Grande
398 do Sul.

- 399 Getz WM (1981) Genetically based kin recognition systems. *J Theor Biol* 92:209–
400 226.
- 401 Giron D e Strand MR (2004) Host resistance and the evolution of kin recognition in
402 polyembryonic wasps. *Proc R Soc Lond B (Suppl)* 27:S395–S398.
- 403 Gould F, Holtzman G, Rabb RL e Smith M (1980) Genetic variation in predatory
404 and cannibalistic tendencies of *Heliothis virescens* strains. *Ann Entomol Soc*
405 *Am* 73:243–250.
- 406 Grafen A (1990) Do animals really recognise kin? *Anim Behav* 39:42-54.
- 407 Greenberg L (1979) Genetic component of bee odor in kin recognition. *Science*
408 206: 1095-1097.
- 409 Grosberg RK e Quinn JF (1986) The genetic control and consequences of kin
410 recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. *Nature* 322: 456-
411 459.
- 412 Haag KL e Araújo AM (1994) Inbreeding, genetic load and morphometric variation
413 in *Dryas iulia*. *Rev Bras Genet* 17:35-39.
- 414 Helanterä H, Lee YR, Drijfhout FP e Martin SJ (2011) Genetic diversity, colony
415 chemical phenotype, and nest mate recognition in the ant *Formica fusca*.
416 *Behav Ecol* doi: 10.1093/beheco/arr037.
- 417 Howard R e Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioural, and biochemical
418 aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50:371–393.
- 419 Joseph SB, Snyder WE e Moore AJ (1999) Cannibalizing *Harmonia axyridis*
420 (Coleoptera: Coccinellidae) larvae use endogenous cues to avoid eating
421 relatives. *J Evol Biol* 12:792-797.

- 422 Lehmann L e Perrin N (2002) Altruism, dispersal, and phenotype-matching kin
423 recognition. *Am Nat* 159:451-468.
- 424 Linsenmair KE (1987) Kin recognition in subsocial arthropods, in particular in the
425 desert isopod *Hemilepistus reaumuri*. In: Fletcher DJ C and Michener CD
426 (eds) *Kin Recognition in Animals*. Wiley, Chichester, pp 411-436.
- 427 Lizé A, Cortesero AM, Bagnères AG e Poinot D (2010) Kin recognition in the
428 larvae of a solitary insect: the cue is in the plug. *Behav Ecol* 21:633-638.
- 429 Manning CJ, Wakeland EK e Potts WK (1992) Communal nesting patterns in mice
430 implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360:581-583.
- 431 Maynard Smith J e Szathmáry E (1995) *The major transitions in evolution*. Oxford,
432 Freeman.
- 433 Michaud JP e Grant AK (2004) Adaptive significance of sibling egg cannibalism in
434 Coccinellidae: comparative evidence from three species. *Ann Entomol Soc*
435 *Am* 97:710-719.
- 436 Moritz RB e Hillesheim E (1990) Trophallaxis and genetic variance of kin
437 recognition in honey bees, *Apis mellifera* L. *Anim Behav* 40:641-647.
- 438 Nehring V, Evison SEF, Santorelli LA, d'Ettorre P e Hughes WHO (2011) Kin-
439 informative recognition cues in ants. *Proc R Soc B* 278:1942-1948.
- 440 Nummelin M (1989) Cannibalism in water striders (Heteroptera: Gerridae). Is there
441 kin recognition? *Oikos* 56:87-90.
- 442 Pfennig DW, Sherman PW e Collins J P (1994) Kin recognition and cannibalism in
443 polyphenic salamanders. *Behav Ecol* 5:225-232.
- 444 Potts WK, Manning CJ e Wakeland EK (1991) Mating patterns in semi-natural
445 populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 352:619–621.

- 446 Rashidi M, Malekiyan M e Gholami M (2008) Egg volume determination by
447 spheroid approximation and image processing. World Appl Sci J 3:590-596.
- 448 Richardson ML, Mitchell RF, Reagel PFe Hanks LM (2010) Causes and
449 consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. Annu Rev Entomol
450 55:39-53.
- 451 Richter P (1986) Inheritance of cannibalism behavior in Noctuid larvae: a single
452 gene hypothesis. Bio Zentralbl 105:615-619.
- 453 Rousset F e Roze D (2007) Constraints on the origin and maintenance of genetic
454 kin recognition. Evolution 61:2320-2330.
- 455 Silva LM e Araújo AM (1994) The genetic structure of *Heliconius erato* populations
456 (Lepidoptera; Nymphalidae). Rev Bras Genet 17:19-24.
- 457 Smiley JT (1978) The host plant ecology of *Heliconius* butterflies in Northeastern
458 Costa Rica. Dissertation (Doctor of Philosophy), The University of Texas at
459 Austin.
- 460 Tarpley MD, Breden F e Chippendale GM (1993) Genetic control of geographic
461 variation for cannibalism in the southwestern corn borer, *Diatraea*
462 *grandiosella*. Entomol Exp Appl 66:145-152.
- 463 Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA e Case TJ (2000) Reduced genetic variation
464 and the success of an invasive species. Proc Natl Acad Sci USA 97: 5948-
465 5953.

CAPÍTULO 5

Discussão Geral

Através dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível responder algumas das perguntas que surgiram a partir do trabalho de De Nardin e Araújo (2011). Neste último, encontraram-se fortes evidências de reconhecimento de parentesco entre as lagartas recém-eclodidas e ovos de *Heliconius erato phyllis*, onde as lagartas, que podem ou não ser canibais, canibalizam preferencialmente ovos não aparentados quando há escolha. No presente trabalho, mostramos que o reconhecimento de parentesco observado nessa espécie pode ter evoluído por seleção de parentesco. Os dados obtidos indicam que lagartas não-canibais, aqui consideradas indivíduos altruístas, têm um custo, por se absterem de uma refeição, que é maior no início do desenvolvimento, principalmente no tempo de sobrevivência sem alimento, e na duração do primeiro ínstar, o que vem a refletir uma maior duração da fase pré-adulta. Porém, para as outras variáveis da ontogenia, canibais não parecem ter vantagens com relação a não-canibais. Com relação aos benefícios para os altruístas, não-canibais têm o benefício de deixar o dobro de irmãos que chegam à fase adulta do que canibais.

Porém, o que se observa é que, apesar de não-canibais deixarem potencialmente mais irmãos, que podem também portar genes para reconhecimento de parentesco, a frequência de canibais é relativamente alta, de pelo menos 50% para ovos irmãos. Isso traz uma nova pergunta: por que o comportamento canibal permanece nas populações, se não-canibais deixam mais irmãos e canibais parecem ter vantagens principalmente no início da ontogenia? Primeiramente, as vantagens dos canibais *principalmente* no início do desenvolvimento e na sobrevivência não devem ser subestimadas, uma vez que horas a mais podem fazer diferença, por exemplo até que a lagarta caminhe e encontre mais folhas. Além disso, numa situação de escassez de folhas (como por exemplo em um ambiente degradado ou com folhas de baixa qualidade com a

aproximação do inverno), como canibais se desenvolvem mais rápido no primeiro estágio, menos folhas seriam necessárias inicialmente para alimentar esta lagarta, e uma menor duração do primeiro ínstar também está relacionada a uma menor suscetibilidade a predadores (em um tempo mais curto as lagartas passam para o segundo ínstar, já com um tamanho um pouco maior). Outra explicação para a permanência do comportamento canibal é que o canibalismo pode ter evoluído em virtude da competição, o que não foi testado neste estudo. Ou seja, o canibalismo poderia ocorrer mais para eliminar competidores do que por vantagens nutricionais. Porém, quando o competidor potencial é um ovo irmão, este é menos frequentemente eliminado. Assim, o reconhecimento de parentesco lagarta-ovo observado em *Heliconius erato phyllis* poderia ter evoluído em decorrência da competição, como observado por Lizé *et al.* (2006) em *Aleochara bilineata* (Coleoptera).

A aplicação da regra de Hamilton de uma forma direta ($rb - c > 0$) é difícil, uma vez que custos e benefícios são difíceis de medir, e muitas vezes não estão nas mesmas unidades. Segundo Gardner *et al.* (2011), os custos e benefícios da regra de Hamilton são os efeitos médios da aptidão direta e indireta de uma predisposição genética para um caráter de interesse, que tendem a ser mediados pelo meio ecológico e genético. No presente trabalho, por exemplo, os benefícios para os altruístas foram medidos através do benefício indireto de deixar mais irmãos que cheguem à idade adulta, e os custos foram medidos através de diferenças na ontogenia apresentadas por egoístas e altruístas. A solução encontrada foi aplicar os resultados obtidos em duas modificações da regra de Hamilton encontradas na literatura (Eickwort, 1973 e Brown, 1975), por meio das quais conseguimos explicar tanto a evolução do altruísmo como do egoísmo nas lagartas de *H. erato phyllis*. Assim podemos dizer que há evidências de que o reconhecimento de parentesco observado nessa espécie tenha evoluído por seleção de parentesco. Embora a teoria da aptidão inclusiva já tenha mais de quarenta anos, ela ainda permanece em debate. Trabalho de Nowak *et al.* (2010) discute essa teoria quanto a sua capacidade de explicar a evolução da eussocialidade, dizendo que esta poderia ter evoluído independentemente da existência da seleção de parentesco, que há poucos trabalhos que mostram

evidências empíricas da teoria da aptidão inclusiva, e questionando sua base matemática. Entretanto, este trabalho sofreu críticas, e várias respostas foram publicadas em desacordo com grande parte do trabalho de Nowak *et al.* (2010) (Abbot *et al.*, 2011; Boomsa *et al.*, 2011; Bourke, 2011; Ferriere e Michod, 2011; Herre e Wcislo, 2011; Strassmann *et al.*, 2011). As respostas discutem, entre outros aspectos, que há sim várias evidências da atuação da seleção de parentesco, a importância do parentesco na evolução da eussocialidade (apesar de já se saber que a haplodiploidia pode ter tido uma importância relativamente menor para a origem da eussocialidade) e a validade da Regra de Hamilton.

Apesar de lagartas de primeiro ínstar reconhecerem ovos que são irmãos biológicos, preferencialmente não os canibalizando, lagartas não tratam lagartas irmãs diferencialmente, nem quando duas lagartas de primeiro estágio foram mantidas juntas, já que nesse caso a frequência de canibalismo entre irmãs e não-parentes foi a mesma, e nem quando lagartas de diferentes instares foram submetidas a encontros. Neste último teste não houve tratamento diferencial, nem quanto ao canibalismo, nem em relação aos demais comportamentos avaliados (indiferença, fuga, ataque e hostilidade). O fato de não haver reconhecimento de parentesco entre lagartas não é surpreendente, uma vez que o canibalismo lagarta-ovo é bem mais frequente, também porque o ovo não pode se defender ou fugir, e porque a proteína contida nos ovos provavelmente está em estado menos diferenciado do que nas larvas e então poderia ser mais eficientemente assimilada (Michaud e Grant, 2004). A ausência de tratamento diferencial entre lagartas irmãs e não-parentes, juntamente com o fato de que a frequência de canibalismo de ovos meio-irmãos paternos (um dos experimentos do presente trabalho) é estatisticamente igual ao canibalismo de ovos não-parentes reforça a ideia de que o sinal utilizado para reconhecer parentes está no córion do ovo. Segundo Lehmann e Perrin (2002), evidências empíricas sugerem que as marcas de reconhecimento usualmente se estendem em um contínuo entre puramente genéticas e primariamente ambientais, as quais devem surgir de um balanço entre diversos fatores interagindo.

Outro resultado intrigante foi a diferença observada no tamanho dos ovos que deram origem a lagartas canibais e não-canibais, quando foram comparados

apenas indivíduos que chegaram a fase adulta. Ovos de lagartas não-canibais foram menores do que aqueles das canibais (e do que dos controles também). Uma análise do peso médio das pupas das fêmeas que deram origem a nove proles (usadas no artigo que trata dos efeitos do endocruzamento nessa dissertação) mostrou que o peso médio da pupa da mãe não está correlacionado à média, moda ou mediana do peso e volume dos ovos que ela coloca (dados não mostrados). Segundo Hodin (2009), a plasticidade do tamanho do ovo em insetos é menos conhecida do que a plasticidade no *timing* reprodutivo ou tamanho da ninhada. Porém há o exemplo do trabalho de Fox *et al.* (1997) que mostrou que as fêmeas de *Stator limbatus* (Coleoptera: Bruchidae) ajustam o tamanho de seus ovos a qualidade da semente de seus hospedeiros da família Fabaceae. Alguns gafanhotos também alteram o tamanho do ovo em resposta a estímulo ambiental. *Chortophaga viridifasciata* e *Arphia sulphurea* “tardamente maduros” produzem poucos ovos grandes em curtos períodos de interoviposição em comparação com fêmeas que “amadurecem” no início da estação (Landa 1992a,1992b). Na borboleta *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae), a temperatura de oviposição influencia no tamanho do ovo: oviposição a 27°C resulta em uma redução maior do que 20% no tamanho do ovo do que oviposição a 20°C (Fischer *et al.*, 2003). Em *Heliconius erato phyllis*, entretanto, mostramos que o tamanho dos ovos não varia significativamente ao longo do período de postura da fêmea, que se estende da metade da primavera até metade do outono aproximadamente, até porque em dias mais frios ou muito quentes a postura diminui bastante. Segundo Fischer e Fiedler (2001), o tamanho do ovo é uma característica particularmente interessante na evolução da história de vida, porque é simultaneamente uma característica materna e da progênie: as mães determinam o tamanho do ovo, o que pode consideravelmente afetar a aptidão da progênie (Azevedo *et al.*, 1997; Fox e Czesak, 2000). Assim, permanece uma dúvida: as fêmeas de *H. erato phyllis* poderiam controlar o tamanho dos ovos de acordo com a disponibilidade de passifloras, já que o tamanho do ovo parece ter relação com o comportamento canibal? O volume médio dos ovos encontrado nesse trabalho foi similar ao relatado em trabalhos citados por García-Barros (2000) (0,59 mm³) e Rodrigues e Moreira (2002) (média 0,8 mm³), bem como às dimensões citadas

por Kaminski *et al.* (2002) ($0,8 \pm 0,001$ mm de diâmetro da base do ovo e $1,481 \pm 0,01$ mm de comprimento).

O canibalismo parece ter um forte componente ambiental, sendo que parece ser mais comum em locais com menor disponibilidade de plantas hospedeiras. Dados não mostrados nos artigos dessa dissertação, devido ao pequeno tamanho amostral para algumas localidades, sugerem que onde há abundância de plantas hospedeiras, a aptidão do não-canibal é maior, já que a soma do número de não-canibais e seus irmãos que chegam à idade adulta é maior do que a de canibais com seus irmãos. Já em locais onde há menos plantas hospedeiras, ou plantas de menor qualidade, a situação se inverte: canibais parecem ter uma maior aptidão. Dependendo do ambiente em que os indivíduos se encontram, é melhor ser canibal ou não-canibal. Esse fato, juntamente com os resultados obtidos através dos cruzamentos realizados, sugerem que o canibalismo em *H. erato phyllis*, embora possa ter um componente genético, tem uma forte influência ambiental; em outras palavras, parece haver uma grande plasticidade fenotípica quanto ao tamanho do ovo. Na verdade, o componente genético parece ser o do reconhecimento de parentes. Na ausência, ou com poucos genes para reconhecimento, a lagarta estaria mais propensa a canibalizar, em condições normais.

Inicialmente, um dos objetivos dessa dissertação era tentar determinar o modo de herança do canibalismo através do cruzamento de indivíduos canibais (irmãos e não-parentes) e não-canibais (irmãos e não-parentes). Porém, o que se observou é que a frequência de canibalismo depende do coeficiente de endocruzamento da prole, e não do comportamento apresentado pelos pais quando lagarta de primeiro estágio recém-eclodida. E com relação aos efeitos do endocruzamento, além da influência no comportamento canibal/não-canibal, observou-se que indivíduos filhos de irmãos ($F = 0,25$) têm uma mortalidade ao longo do desenvolvimento maior, e os adultos são menores do que os filhos de indivíduos não-aparentados, embora não haja diferença nas demais variáveis da ontogenia avaliadas.

Uma questão interessante é que as borboletas coletadas em campo, em locais com diferentes condições de plantas hospedeiras, foram mantidas em

insetários, que tinham aproximadamente a mesma disponibilidade e qualidade de plantas. Apesar disso, as proles de borboletas oriundas de locais com pouca disponibilidade de plantas foram mais canibais do que as oriundas de locais melhores nesse quesito. Essa informação gera mais perguntas: teriam as fêmeas uma memória do local de onde vieram, e de alguma forma passariam essa informação para a prole se comportar de uma maneira ou de outra (por exemplo, alguma forma de *imprinting* genômico)? Ou seria alguma variação populacional quanto ao comportamento canibal/não-canibal?

Perspectivas

Além das questões já levantadas até aqui, há muitas outras. Já que aparentemente há vários genes relacionados ao reconhecimento de parentesco, seria interessante uma abordagem molecular tentando identificar onde estão esses genes. Isso poderia ser feito através de uma análise de QTL (*quantitative trait loci*), já que este é um método estatístico que trata de características fenotípicas e genéticas, por meio da utilização de marcadores moleculares que estejam em desequilíbrio de ligação com os alelos segregantes nos locos que influenciam a característica do tratamento diferencial dado a parentes. Dessa forma, seria possível responder se as diferenças observadas no fenótipo são devidas a poucos locos com efeitos relativamente grandes, ou muitos locos, cada um com efeitos pequenos. No caso de *H. erato* já existem mapas genéticos para o conjunto cromossômico (Tobler *et al.*, 2005), que poderiam ser utilizados como um referencial na busca por marcadores moleculares.

Outra possível abordagem é fazer uma análise do perfil químico do córion do ovo, comparando irmãos e não-parentes. Um complemento a essa análise é, através de marcadores moleculares, como microssatélites, avaliar o parentesco genético entre indivíduos, e fazer uma correlação entre o perfil químico do córion e o perfil genético.

Uma questão que não foi respondida nessa dissertação foi a da relação entre condições ambientais experimentadas pela mãe, por exemplo pouca disponibilidade/má qualidade de plantas hospedeiras e a frequência de ovos pequenos ou grandes e do canibalismo. Tanto um aporte experimental como de campo seriam suficientes para resolver esse problema.

Uma abordagem focada no comportamento canibal e reconhecimento de parentesco em outros heliconíneos também seria interessante, já que há relato de poucas espécies nesse grupo que são canibais (além de *H. erato phyllis*, *Dryas iulia*). Assim, um estudo da filogenia do comportamento canibal seria de grande valia para saber se se trata de uma apomorfia no grupo onde está *H. erato* ou é uma plesiomorfia.

Finalmente, para que algumas conclusões do presente trabalho tenham maior confiabilidade, seria interessante aumentar a amostra de cruzamentos entre canibais e entre não-canibais, irmãos e não-parentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot P *et al.* (2011) Inclusive fitness theory and eusociality. *Nature* 471:E1-E4.
- Adams ES (1991) Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite *Microcerotermes arboreus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2031-2034.
- Agarwala BK e Dixon AFG (1993) Kin recognition: egg larval cannibalism in *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur J Entomol* 90:45-50.
- Arnold KE (2000) Kin recognition in rainbowfish (*Melanotaenia eachamensis*): sex, sibs and shoaling. *Behav Ecol Sociobiol* 48:385–391.
- Azevedo RBR, French V e Partridge L (1997) Life-history consequences of egg size in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 150:250–282.
- Barros-Bellanda HCH e Zucoloto FS (2001) Influence of chorion ingestion on the performance of *Ascia monuste* and its association with cannibalism. *Ecol Entomol* 26:557-561.
- Barros-Bellanda HCH e Zucoloto FS (2005) Egg cannibalism in *Ascia monuste* in the field; opportunistic, preferential and very frequent. *J Ethol* 23:133-138.
- Beltrán M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E e Mallet J (2007) Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biol J Linn Soc* 92:221–239.
- Beye M, Neumann P, Chapuisat M, Pamilo P e Moritz RFA (1998) Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behav Ecol Sociobiol* 43:67–72.
- Blaustein AR (1983) Kin recognition mechanisms: phenotypic matching or recognition alleles? *Am Nat* 121:749-754.
- Blaustein AR, Bekoff M, Byers JA e Daniels TJ (1991) Kin recognition in vertebrates: what do we really know about adaptive value? *Anim Behav* 41:1079-1083.
- Boomsa JJ *et al.* (2011) Only full-sibling families evolved eusociality. *Nature* 471:E4-E5.

- Boots M (1998) Cannibalism and the stage-dependent transmission of a viral pathogen of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Ecol Entomol* 23:118–122.
- Borges EO, Faccioni-Heuser MC e Moreira GRP (2010) Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Psyche* 2010:1-9.
- Bourke AFG (2011) The validity and value of inclusive fitness theory. *Proc R Soc Lond B* 278:3313-3320.
- Breed MD e Bennett B (1987) Kin recognition in highly eusocial insects. In: Fletcher DJ C e Michener CD, editors. *Kin Recognition in Animals*. Wiley, Chichester, pp. 243-285.
- Brower L (1961) Experimental analyses of egg cannibalism in the Monarch and Queen butterflies, *Danaus plexippus* and *D. gilippus berenice*. *Physiol Zool* 34:287-296.
- Brown JL. (1975) *The Evolution of Behavior*. New York: Norton. Appendix, p. 735 – 736
- Brown Jr. KS e Mielke OHH. 1972. The heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. *Zoologica* 57:1–40.
- Buckling A e Brockhurst MA (2008) Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100:484–488.
- Buczkowski G e Silverman J (2005) Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentina ant. *Anim Behav* 69:741-749.
- Cárcamo HA e Spence JR (1994) Kin discrimination and cannibalism in water striders (Heteroptera: Gerridae): another look. *Oikos* 70:412-416.
- Cardoso MZ (2010) Reconstructing seasonal range expansion of the tropical butterfly, *Heliconius charithonia*, into Texas using historical records. *J Insect Sci* 10:69.
- Cardoso MZ, Roper JJ e Gilbert LE (2009) Prenuptial agreements: mating frequency predicts gift-giving in *Heliconius* species. *Entom Experim Appl* 131:109–114.

- Chapman JW, Williams T, Escribano A, Caballero P, Cave RD e Goulson D (1999) Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Behav Ecol* 10:298-303.
- Chapman JW, Williams T, Martínez AM, Cisneros J, Caballero P, Cave RD e Goulson D (2000) Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) reduce the risk of predation? *Behav Ecol Sociobiol* 48:321-327.
- Counterman BA, Araujo-Perez F, Hines HM, Baxter SW, Morrison CM, Lindstrom DP, Papa R, Ferguson L, Joron M, French-Constant R, Smith CP, Nielsen DM, Chen R, Jiggins CD, Reed RD, Halder G, Mallet J, McMillan WO (2010) Genomic hotspots for adaptation: the population genetics of mullerian mimicry in *Heliconius erato*. *PLOS Genetics* 6(2):e1000796.
- Crozier RH (1986) Genetic clonal recognition abilities in marine invertebrates must be maintained by selection for something else. *Evolution* 40:1100–1101.
- Dawkins R (1976) *The selfish gene*. Oxford University Press, New York.
- De Nardin J e Araújo AM (2011) Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *J Ethol* 29:499–503.
- DeVries P (1987) *Butterflies of Costa Rica and Their Natural History*. Princeton University Press. Princeton.
- Dickinson JL (1992) Egg cannibalism by larvae and adults of the milkweed leaf beetle (*Labidomera clivicollis*, Coleoptera: Chrysomelidae). *Ecol Entomol* 17:209–218.
- Dobler R e Kölliker M (2010) Kin-selected siblicide and cannibalism in the European earwig. *Behav Ecol* 21:257-263.
- Downs SG e Ratnieks FLW (1999) Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. *Anim Behav* 58:643-648.
- Dudley SA e File AL (2007) Kin recognition in an annual plant. *Biol Lett* 3:435-438.
- Duelli P (1981) Is larval cannibalism in lacewings adaptive? (Neuroptera: Chrysopidae). *Res Pop Ecol* 23:193-209.
- Eickwort KR (1973) Cannibalism and kin selection in *Labidomera clivicollis* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Am Nat* 107:452-453.

- Elwood R (1992) Pup-cannibalism in rodents: causes and consequences. In Elgar MA e Crespi BJ (eds) *Cannibalism: Ecology and evolution among diverse taxa*. Oxford: Oxford University Press.
- Estrada C e Jiggins CD (2008) Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? *J Evol Biol* 21:749-760.
- Faraji F, Janssen A, Van Rijn PCJ e Sabelis MW (2000) Kin recognition by the predatory mite *Iphiseius degenerans*: discrimination among own, conspecific, and heterospecific eggs. *Ecol Entomol* 25:147-155.
- Ferguson LC e Jiggins CD (2009) Shared and divergent expression domains on mimetic *Heliconius* wings. *Evol Developt* 11:498-512.
- Ferriere R e Michod RE (2011) Inclusive fitness in evolution. *Nature* 471:E6-E8.
- Fischer K e Fiedler K (2001) Egg weight variation in the butterfly *Lycaena hippothoe*: more small or fewer large eggs? *Popul Ecol* 43:105–109.
- Fischer K, Bot ANM, Brakefield PM e Zwaan BJ (2003) Fitness consequences of temperature-mediated egg size plasticity in a butterfly. *Funct Ecol* 17:803–810.
- Fox LR (1975) Cannibalism in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst* 6:87-106.
- Fox CW, Thakar MS e Mousseau TA (1997) Egg size plasticity in a seed beetle: an adaptive maternal effect. *Am Nat* 149:149–163.
- Fox CW, Czesak ME (2000) Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annu Rev Entomol* 45:341–369.
- Gamboa GJ, Reeve HK, Holmes WG (1991) Conceptual issues and methodology in kin-recognition research: a critical discussion. *Ethology* 88:109-127.
- García-Barros E (2000) Egg size in butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperidae): a summary of data. *J Res Lepid* 35:90–136.
- Gardner A e West SA (2007) Social evolution: the decline and fall of genetic kin recognition. *Curr Biol* 17:R810-R812.
- Gardner A, West SA e Wild G (2011) The genetical theory of kin selection. *J Evol Biol* 24:1020-1043.
- Giraldo N, Salazar C, Jiggins CD, Bermingham E e Linares M (2008) Two sisters in the same dress: *Heliconius* cryptic species. *BMC Evol Biol* 8:324.

- Giron D e Strand MR (2004) Host resistance and the evolution of kin recognition in polyembryonic wasps. *Proc R Soc Lond B (Suppl)* 27:S395–S398.
- Goff PW e Stevens L (1995) A test of Hamilton's rule: cannibalism and relatedness in beetles. *Anim Behav* 49:545–547.
- Grafen A (1990) Do animals really recognise kin? *Anim Behav* 39:42-54.
- Green WW, Mirza RS e Pyle GG (2008) Kin recognition and cannibalistic behaviours by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Naturwissenschaften* 95: 269-272.
- Greenberg L (1979) Genetic component of bee odor in kin recognition. *Science* 206: 1095-1097.
- Griffin AS e West SA (2002) Kin selection: fact and fiction. *Trends Ecol Evolut* 17:15-21.
- Griffin AS, West AS e Buckling A (2004) Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 430:1024-1027.
- Grosberg RK e Quinn JF (1986) The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. *Nature* 322:456-459.
- Haig D (1996) Gestational drive and the green-bearded placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6547–6551.
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour. I. *J Theor Biol* 7:1-16.
- Hare JF e Eisner T (1995) Cannibalistic caterpillars (*Utetheisa ornatrix*; Lepidoptera: Arctiidae) fail to differentiate between eggs on the basis of kinship. *Psyche* 102:27-33.
- Herbers JM (2009) Darwin's 'one special difficulty': celebrating Darwin 200. *Biol Lett* 5:214-217.
- Herre EA e Wcislo WT (2011) In defence of inclusive fitness theory. *Nature* 471:E8-E9.
- Hodin J (2009) She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction. In: Whitman DW, Ananthakrishnan TN (eds) *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, pp 423-521.

- Holmes WG (2004) The early history of Hamiltonian based research on kin recognition. *Ann Zool Fenn* 41:691-711.
- Jiggins CD, Salazar C, Linares M e Mavarez J (2008) Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. *Phil Trans R Soc B* 363:3047–3054.
- Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas ALV (2011) Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biol J Linn Soc* 102:765–774.
- Joron M, Jiggins CD, Papanicolaou A e McMillan WO (2006) *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* 97:157-167.
- Joseph SB, Snyder WE e Moore AJ (1999) Cannibalizing *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) larvae use endogenous cues to avoid eating relatives. *J Evol Biol* 12:792-797.
- Joyner K e Gould F (1985) Developmental consequences of cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera, Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am* 78:24-28.
- Kakimoto T, Fujisaki K e Miyatake T (2003) Egg laying preference, larval dispersion and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am* 96:793-798.
- Kaminski LA, Tavares M, Ferro VG e Moreira GRP (2002) Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Rev Bras Zool* 19:977-993.
- Klein AL e Araújo AM (2010) Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? *J Ethol* 28:409-420.
- Kruczek M (2007) Recognition of kin in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Phys Behav* 90:483–489.
- Landa K (1992a) Seasonal declines in offspring fitness and selection for early reproduction in nymph-overwintering grasshoppers. *Evolution* 46:121–135.
- Landa K (1992b) Adaptive seasonal variation in grasshopper offspring size. *Evolution* 46:1553–1558.

- Lehmann L e Perrin N (2002) Altruism, dispersal, and phenotype-matching kin recognition. *Am Nat* 159:451-468.
- Liebert AE e Starks PT (2004) The action component of recognition systems: a focus on the response. *Ann Zool Fennici* 41:747-764.
- Linsenmair KE (1987) Kin recognition in subsocial arthropods, in particular in the desert isopod *Hemilepistus reaumuri*. In: Fletcher DJ C and Michener CD (eds) Kin recognition in animals. Wiley, Chichester, pp 411-436.
- Lizé A, Carval D, Cortesero AM, Fournet S e Poinso D (2006) Kin discrimination and altruism in the larvae of a solitary insect. *Proc R Soc Lond [Biol]* 273:2381-2386.
- Loekle DM, Madison DM e Christian JJ (1982) Time dependency and kin recognition of cannibalistic behaviour among Poeciliid fishes. *Behav Neural Biol* 35:315-318.
- Mann KD, Turnell ER, Atema J e Gerlach G (2003) Kin recognition in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) based on olfactory cues. *Biol Bull* 205:224–225.
- Manning CJ, Wakeland EK e Potts WK (1992) Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360:581-583.
- Mateo JM (2002) Kin-recognition abilities and nepotism as a function of sociality. *Proc R Soc Lond B* 269:721-727.
- Mateo JM (2004) Recognition systems and biological organization: the perception component of social recognition. *Ann Zool Fennici* 41:729-745.
- Mehdiabadi NJ, Jack CN, Farnham TT, Platt TG, Kalla SE, Shaulsky G, Queller DC e Strassmann JE (2006) Kin preference in a social microbe. *Nature* 442:881-882.
- Mehdiabadi NJ, Kronforst MR, Queller DC e Strassmann JE (2008) Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba *Dictyostelium purpureum*. *Evolution* 63:542–548.
- Mehlis M, Bakker TCM, Engqvist L e Frommen JG (2010) To eat or not to eat: egg-based assessment of paternity triggers fine-tuned decisions about filial cannibalism. *Proc R Soc Lond [Biol]* 277:2627-2635.

- Michaud JP, Grant AK. 2004. Adaptive Significance of Sibling Egg Cannibalism in Coccinellidae: Comparative Evidence from Three Species. *Ann Entomol Soc Am* 97:710-719.
- Moore J (2007) Perspective: Phenotype matching and inbreeding avoidance in African elephants. *Molec Ecol* 16:4421-4423.
- Moore T e Moore HD (2002) Marsupial sperm pairing: a case of 'sticky' green beards? *Trends Ecol Evol* 17:112-113.
- Moritz RB e Hillesheim E (1990) Trophallaxis and genetic variance of kin recognition in honey bees, *Apis mellifera* L. *Anim Behav* 40:641-647.
- Moura PA, Quek SP, Cardoso MZ, Kronforst MR (2011) Comparative population genetics of mimetic *Heliconius* butterflies in an endangered habitat; Brazil's Atlantic Forest. *BMC Genetics* 12:9.
- Mumme RL, Koenig WD e Pitelka FA (1983) Reproductive competition in the communal acorn woodpecker: sisters destroy each other's eggs. *Nature* 306:583- 584.
- Nowak M, Tarnita CE e Wilson EO (2010) The evolution of eusociality. *Nature* 466: 1057-1062.
- Nummelin M (1989) Cannibalism in water striders (Heteroptera: Gerridae). Is there kin recognition? *Oikos* 56:87-90.
- O'Riain MJ e Jarvis JUM (1997) Colony member recognition and xenophobia in the naked mole rat. *Anim Behav* 53:487-498.
- Osawa N (1989) Sibling and non-sibling cannibalism by larvae of a lady beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in the field. *Res Pop Ecol* 31:153-160.
- Ostrowski EA, Katoh M, Shaulsky G, Queller DC e Strassmann JE (2008) Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PLoS Biol* 6:2376-2382.
- Pajunen VI e Pajunen I (1991) Oviposition and egg cannibalism in rock-pool (Hemiptera: Corixidae). *Oikos* 60:83-90.
- Papanicolaou A., Gebauer-Jung S, Blaxter ML, MacMillan WO, Jiggins CD (2008) ButterflyBase: a platform for lepidopteran genomics. *Nucleic Ac Res* 36:D582-D587.

- Paterson S e Hurst JL (2009) How effective is recognition of siblings on the basis of genotype? *J Evol Biol* 22:1875-1881.
- Patterson L, Dick JTA e Elwood RW (2008) Embryo retrieval and kin recognition in an amphipod (Crustacea). *Anim Behav* 76:717-722.
- Penn DJ e Frommen JG (2010) Kin recognition: an overview of conceptual issues, mechanisms and evolutionary theory. In: Kappeler, P editor. *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*. 1 ed. Springer, Heidelberg, pp 55-85.
- Pfennig DW (1997) Kinship and cannibalism. *BioScience* 47:667-675.
- Pfennig DW, Reeve HK e Sherman PW (1993) Kin recognition and cannibalism in spadefoot toad tadpoles. *Anim Behav* 46:87-94.
- Pfennig DW, Sherman PW e Collins J P (1994) Kin recognition and cannibalism in polyphenic salamanders. *Behav Ecol* 5:225-232.
- Pfennig DW, Collins JP e Ziemba RE (1999) A test of alternative hypotheses for kin recognition in cannibalistic tiger salamanders. *Behav Ecol* 10:436-443.
- Pierce NE (1995) Predatory and parasitic Lepidoptera: carnivores living on plants. *J Lepid Soc* 49:412-453.
- Polis GA (1981) The evolution and dynamics of intraspecific predation. *Annu Rev Ecol Systemat* 12:225-251.
- Potts WK, Manning CJ e Wakeland EK (1991) Mating patterns in semi-natural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 352:619-621.
- Reed DJ, Begon M e Thompson DJ (1996) Differential cannibalism and population dynamics in a host-parasitoid system. *Oecol* 105:189-193.
- Reed RD, Papa R, Martin A, Hines HM, Counterman BA, Pardo-Diaz C, Jiggins CD, Chamberlain NL, Kronforst MR, Chen R, Halder G, Nijhout HF e McMillan WO (2011) *optix* drives the repeated convergent evolution of butterfly wing pattern mimicry. *Science* 333:1137-1141.
- Richardson ML, Mitchell RF, Reagel PFe Hanks LM (2010) Causes and Consequences of Cannibalism in Noncarnivorous Insects. *Annu Rev Entomol* 55:39-53.
- Richter P (1986) Inheritance of cannibalism behavior in Noctuid larvae: a single gene hypothesis. *Bio Zentralbl* 105:615-619.

- Rodrigues D e Moreira GRP (2002) Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Braz J Biol* 62:321-332.
- Rousset F e Roze D (2007) Constraints on the origin and maintenance of genetic kin recognition. *Evolution* 61:2320-2330.
- Santos RA e Araújo AM (1991) Ecologia comportamental e seleção de parentesco em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Rev Bras Genet*, 2 (supl.): 261.
- Schausberger P e Croft BA (2001) Kin recognition and larval cannibalism by adult females in specialist predaceous mites. *Anim Behav* 61:459–464.
- Schneider JM e Bilde T (2008) Benefits of cooperation with genetic kin in a subsocial spider. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10843-10846.
- Schweitzer DF (1979) Predatory behaviour in *Lithophane querquera* and other spring caterpillars. *J Lepid Soc* 33:129-134.
- Sharp SP, McGowan A, Wood MJ e Hatchwell BJ (2005) Learned kin recognition cues in a social bird. *Nature* 434:1127-1130.
- Sherborne AL, Thom MD, Paterson S, Jury F, Ollier WER, Stockley P, Beynon RJ e Hurst JL (2007) The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Curr Biol* 17:2061–2066.
- Sherman PW, Reeve HK, Pfennig DW (1997) Recognition systems. In: Krebs JR, Davies NB (eds) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell, Oxford, pp 69-98.
- Sherratt TN, Ruff SE e Church SC (1999) No evidence for kin discrimination in cannibalistic tree-hole mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Insect Behav* 12:123-132.
- Sigsgaard L, Greenstone MH e Duffield SJ (2002) Egg cannibalism in *Helicoverpa armigera* on sorghum and pigeonpea. *BioControl* 47:151-165.
- Stevens L (1989) The genetics and evolution of cannibalism in flour beetles (Genus *Tribolium*). *Evolution* 43:169-179.
- Strassmann JE, Page Jr RE, Robinson GE e Seeley TD (2011) Kin selection and eusociality. *Nature* 471:E5-E6.

- Summers K, Crespi B (2005) Cadherins in maternal-foetal interactions: red queen with a green beard? *Proc R Soc Lond B* 272:643-649.
- Tarpley MD, Breden F e Chippendale GM (1993) Genetic control of geographic variation for cannibalism in the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Entomol Exp Appl* 66:145-152.
- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E, Jiggins CD, Johntson JS, Heckel DG e McMillan WO (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94:408–417.
- Trivers RL (1971) The Evolution of Reciprocal Altruism. *Quart Rev Biol* 46:35-57.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA e Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5948-5953.
- Via S (1999) Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82:267-275.
- Waldman B (1988) The ecology of kin recognition. *Annu Rev Ecol Syst* 19:543-571.
- Waldman B (1991) Kin recognition in amphibians. In: Hepper P (ed) *Kin Recognition*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 162-219.
- Watanabe M, Yamaguchi H. 1993. Egg cannibalism and egg distribution of two *Pieris* butterflies, *Pieris rapae* and *P. melete* (Lepidoptera, Pieridae), on a host plant, *Rorippa indica* (Cruciferae). *Jpn J Ecol* 43:181–188.
- Williams T e Hernández O (2006) Costs of cannibalism in the presence of an iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*. *Ecol Entomol* 31:106-113.
- Zago-Braga RC e Zucoloto FS (2004) Cannibalism studies on eggs and newly hatched caterpillars in a wild population of *Ascia monuste* (Godart) (Lepidoptera, Pieridae). *Rev Bras Entomol* 48:415-420.