

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Reconhecimento de parentesco em *Heliconius erato phyllis*:
abordagens genética e química**

Janaína De Nardin

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Mellender de Araújo

Porto Alegre

Maio de 2016

INSTITUIÇÃO EXECUTORA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Laboratório de Genética Ecológica

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Laboratório de Evolução Molecular

Laboratório de *Drosophila*

Instituto de Química

Departamento de Química Inorgânica

Laboratório de Química Analítica e Ambiental

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Uva e Vinho

Laboratório de Genética Molecular Vegetal

AGENTES FINANCIADORES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Bolsa de Doutorado – Processo 141920/2012-2

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Aos meus pais, Zenei e Gilberto.

AGRADECIMENTOS

Uma tese é construída com a participação e apoio fundamental de muitas pessoas. Desse modo, primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Aldo Mellender de Araújo, pela orientação, incentivo, amizade, auxílio e caronas para os trabalhos de campo e rodadas de chimarrão.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda nos cuidados das lagartas e borboletas, pelo auxílio em campo, pela amizade e muitas risadas: Alexsander Teixeira, Aline Maciel, Ana Carolina Aymone, Ana Carolina da Silva, André Luis Klein, Bruna Oliveira Missaggia, Cláudio Reis, Etiele de Senna Silveira, Leonardo Luvison, Luciana da Silva, Marcelo Costa, Natasha Nonemacher Magni, Pietro Pollo, Ronaldo Paesi, Rosana Huff, Thiana Alissa Arisi, Tiziane Molina, Vanessa Ferrer.

Um agradecimento especial à Luciana da Silva, pela confiança em mim depositada para ser sua co-orientadora de Trabalho de Conclusão de Curso, e pela co-autoria em dois artigos dessa tese. Agradeço também à Bruna Oliveira Missaggia pela confiança para sua co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso, referente a um trabalho do meu Mestrado, mas cujo TCC e publicação do artigo se deram durante o período do meu doutorado.

Com relação ao auxílio em campo, agradeço também ao Jorge Bernardo Silva e à Mayara Delagnelo de Medeiros.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, especialmente ao Professor Nelson Fagundes, pela oportunidade de realizar a Prática de Ensino na disciplina de Genética Ecológica e Evolução, no CECLIMAR.

Ao Elmo Cardoso, pela disponibilidade, paciência, e serviços prestados a todos.

Aos professores José Fernandes Barbosa Neto, Fernanda Bered, Luís Fernando Revers e Tânia Mara Pizzolato pela ajuda e disponibilidade na elaboração do meu anteprojeto de doutorado.

À Professora Loreta Brandão de Freitas pelos ensinamentos e pelo espaço cedido em seu laboratório para a extração de DNA. Deixo aqui também o agradecimento aos demais membros do Laboratório de Evolução Molecular Vegetal, em especial ao Geraldo Mader, pela

orientação nas extrações de DNA, e à Maikel Reck Kortmann, pelas dicas com relação aos AFLPs.

À Professora Vera e a todo pessoal do Laboratório de *Drosophila*.

Agradeço a Gabriela Pasqualim, e às professoras Loreta, Vera, Karen e Maríndia, pela ajuda em tentar encontrar o problema nas extrações de DNA. (Foram meses gastos buscando uma solução, mas era a RNase que estava com problema!) Ao Giancarlo Pasquali, pelo empréstimo do equipamento TissueLyser.

À Professora Tânia Mara Pizzolato e ao Alexsandro Dallegrove, pela colaboração, por terem aceitado a parceria, e pelos ensinamentos, e ao pessoal do Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS.

À Vanessa Buffon e ao Luis Fernando Revers pelo acolhimento, ensinamentos e parceria. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da EMBRAPA Uva e Vinho, de Bento Gonçalves.

Aos professores Ricardo Coletta (Unicamp), Claudete Ruas (UEL) e Katia Rocha (USP), pela assessoria quando o sequenciador estragou.

Às professoras Sídia Callegari-Jacques e Gabriela Cybis pelas ajudas estatísticas.

Ao Jorge, pelo carinho, compreensão e amor.

Ao meu irmão Rodrigo, que sempre contribuiu com meu trabalho, seja revisando textos ou dando uma olhada nos testes de canibalismo, e por compartilhar comigo o amor pela ciência.

Aos meus pais, Zenei e Gilberto, por tudo. Pelo amor, carinho e incentivo, mas também pelos muitos plantios de maracujás, conserto e fabricação de puçás, e pelas muitas contribuições para o Laboratório de Genética Ecológica. Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| CAPÍTULO 1 | 12 |
| Introdução Geral | 12 |
| 1.1. Altruísmo, seleção de parentesco e reconhecimento de parentesco | 12 |
| 1.2. Do fenótipo ao genótipo: QTL, genética quantitativa e herdabilidade | 19 |
| 1.3. Do fenótipo ao genótipo: QTL e marcadores moleculares | 20 |
| 1.4. Do fenótipo ao genótipo: estudos de associação e análises de ligação..... | 23 |
| 1.5. O reconhecimento de parentesco e os sinais químicos | 25 |
| 1.6. <i>Heliconius erato phyllis</i> : organismo de estudo | 29 |
| Objetivos | 34 |
| Referências | 35 |
| CAPÍTULO 2..... | 51 |
| Kin recognition in a butterfly:inferences about its heritability..... | 51 |
| CAPÍTULO 3..... | 68 |
| A first survey of the chemistry for kin recognition in the butterfly <i>Heliconius erato phyllis</i> | 68 |
| CAPÍTULO 4..... | 85 |
| Associação entre marcadores moleculares e fenótipos relacionados ao reconhecimento de parentesco em uma borboleta: um estudo preliminar | 85 |
| CAPÍTULO 5..... | 116 |
| Comparative effects of inbreeding and outbreeding on the ontogeny of <i>Heliconius erato</i> <i>phyllis</i> (Lepidoptera; Nymphalidae)..... | 116 |

| | |
|------------------------------|-----|
| CAPÍTULO 6..... | 130 |
| Discussão Geral | 130 |
| Síntese dos resultados | 130 |
| Discussão | 131 |
| Referências | 141 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
- C – Canibal
- CNR – Canibal que não reconhece irmãos
- CR – Canibal que reconhece irmãos
- CS – Canibal super (Canibal tanto do ovo irmão como do ovo não parente)
- GC-FID – *Gas chromatography with flame ionization detection*, ou cromatografia a gás com detector por ionização de chama
- GC-MS – *Gas chromatography–mass spectrometry*, ou cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
- KMO – *Kaiser-Meyer-Olkin*; mede a adequação da amostra para o conjunto de dados global, na análise de componentes principais.
- NC – Não canibal
- NCS – Não-canibal super – lagarta que não canibaliza nenhum ovo
- PCA – *Principal Components Analysis* (Análise de componentes principais)
- PCR – *Polymerase chain reaction*, ou reação em cadeia da polimerase
- SSR – *Simple sequence repeat*, ou sequências simples repetidas, também denominadas de microssatélites

RESUMO

O reconhecimento de parentesco foi documentado em várias espécies de animais, plantas e bactérias. Ele é fundamental nas interações altruísticas, nas quais o agente altruísta sacrifica algo de sua aptidão individual para beneficiar o receptor e indiretamente aumentar a sua aptidão inclusiva, desde que o receptor seja um parente biológico. Reconhecimento de parentesco foi observado em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae), cujas lagartas recém-eclodidas podem canibalizar ovos, sendo a frequência de canibalismo de ovos irmãos significativamente inferior a de ovos não-relacionados. Os objetivos desse trabalho foram: elucidar a herança do reconhecimento de parentesco (não-canibalismo), e estimar sua herdabilidade; avaliar a natureza molecular da informação coriônica, ou o perfil químico do córion, bem como o perfil de lagartas recém-eclodidas; associar marcadores moleculares com fenótipos comportamentais relacionados ao reconhecimento de parentesco e, finalmente, avaliar efeitos do endocruzamento, buscando compreender possíveis efeitos que o reconhecimento de parentesco pode ter nas populações. Observou-se que o reconhecimento de parentesco, avaliado pelo não-canibalismo de ovos irmãos, parece ter um componente herdável. Sugere-se que a herança do reconhecimento de parentesco seja quantitativa, com limiar de manifestação, dependendo assim de muitos genes, além de fatores ambientais. O perfil químico de lagartas recém-eclodidas e de ovos difere quantitativamente para vários compostos, embora qualitativamente seja bastante semelhante. Além disso, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre famílias para vários compostos, tanto em córions como em lagartas recém-eclodidas. Alguns compostos diferiram entre famílias apenas nas amostras de córion, outros apenas nas amostras de lagartas, e outros compostos diferiram para ambos os materiais. Foram encontradas algumas associações entre marcadores moleculares AFLP e SSR e os fenótipos comportamentais relacionados ao reconhecimento de parentesco, nos dois delineamentos experimentais adotados. Além disso, observou-se depressão endogâmica apenas para algumas características relacionadas à história de vida. Os resultados obtidos ajudam a compreender o processo de reconhecimento de parentesco e altruísmo em uma espécie que não é social, e que também é um modelo para vários estudos evolutivos.

ABSTRACT

Kin recognition has been documented in various species of animals, plants, and bacteria. It is essential in altruistic interactions, in which an altruistic agent sacrifices some of its individual fitness to benefit the receiver, and indirectly increases its inclusive fitness, given that the receiver be a biological relative. Kin recognition is observed in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae), whose newly hatched larvae can cannibalize eggs, and the cannibalism frequency of sibling eggs is significantly lower than that of non-related eggs. The objectives of this study were to elucidate the inheritance of kin recognition (non-cannibalism), and estimate its heritability; to evaluate the molecular nature of chorionic information, or chemical profile of the chorion, and of the newly hatched larvae profile; to associate molecular markers with behavioral phenotypes related to kin recognition; and, finally, to evaluate the effects of inbreeding, seeking to understand the possible effects of kin recognition on populations. It was observed that the recognition of relatedness, as revealed by non-cannibalism of sibling eggs, seems to have a heritable component. It is suggested that the inheritance of kin recognition is quantitative, with threshold manifestation, depending on many genes, as well as environmental factors. The chemical profile of newly hatched larvae and eggs differs quantitatively for various compounds, although qualitatively it is quite similar. In addition, there were statistically significant differences between families for various compounds, including both chorions and newly hatched larvae. Some compounds differ among families only with respect to the chorion samples, others only to larval samples, and other compounds differ for both materials. We have found some associations between the molecular markers AFLP and SSR and behavioral phenotypes related to kin recognition, in both experimental designs adopted. Moreover, inbreeding depression was observed only for some features related to life history. These results help to understand the kin recognition process and altruism in a species that is not social, and which also serve as a model for many evolutionary studies.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1.1. Altruísmo, seleção de parentesco e reconhecimento de parentesco

Compreender as origens evolutivas e mecanismos envolvidos na manutenção da cooperação é um problema central na biologia. Especificamente, não é claro porque um indivíduo (doador) ajuda um outro (beneficiário), se isto é custoso (Darwin, 1859; Smith, 2014). Insetos sociais, e suas castas não-reprodutivas, têm fascinado historiadores naturais por milênios. Para Darwin, eles apresentavam uma dificuldade para sua teoria da evolução por seleção natural. Como poderiam castas estéreis evoluírem, se o sucesso reprodutivo dirige a evolução? (Wang, 2014). Na verdade, Darwin lutou com o enigma do altruísmo não só em insetos sociais, mas também em humanos (Costa, 2013). Atos sociais, desde a menor ajuda ao auto-sacrifício, são vistos em todas as formas de vida, de humanos a microrganismos (Leggett *et al.*, 2014).

Uma explicação para esse enigma evolutivo surgiu com a teoria da aptidão inclusiva (Hamilton, 1964a, 1964b). Embora Charles Darwin (1859), Ronald A. Fisher (1930) e John B. S. Haldane (1932) independentemente criaram a noção de que parentesco pode explicar a evolução social, foi William D. Hamilton (1964) que revolucionou a teoria evolutiva com a desigualdade: $b \times r > c$. Essa desigualdade prevê que a propagação de comportamentos de ajuda ocorrerá quando os benefícios na aptidão (b) para o beneficiário, multiplicados pelo coeficiente de parentesco entre o doador e o beneficiário (r), são maiores que os custos (c) para o doador. Assim, Hamilton propôs que genes codificando para fenótipos cooperativos podem ser passados diretamente (através da reprodução pessoal de um indivíduo) e/ou indiretamente (através da reprodução de um parente com o qual o indivíduo compartilha genes) (Smith, 2014). Ou seja, o conceito de aptidão inclusiva (*inclusive fitness*) destaca que a aptidão de um indivíduo pode ser dividida em dois componentes: a aptidão direta, que resulta da reprodução pessoal do indivíduo, e a aptidão indireta, que resulta da reprodução adicional dos parentes do indivíduo altruísta, possibilitada por suas ações. A aptidão inclusiva aumenta quando os parentes alcançam um sucesso além do que teriam alcançado se não tivessem ajuda. A seleção natural que favorece a disseminação de alelos que aumentam o componente

indireto da aptidão é chamada seleção de parentesco (*kin selection*) (Freeman e Herron, 2009). O termo “seleção de parentesco” foi cunhado por John Maynard Smith (1964) e Eric Charnov (1977) imortalizou a contribuição de Hamilton ao nomear o resultado do cerne matemático da teoria da seleção de parentesco como “regra de Hamilton”. A teoria da seleção de parentesco agora fornece as bases para o estudo da evolução social (Frank, 1998) (Gardner, 2015).

A seleção de parentesco, portanto, ocorre se há associação genética entre o doador e o beneficiário de seu comportamento altruísta. Os mecanismos asseguram essa associação genética são: viscosidade da população, reconhecimento de parentesco e efeito “barba verde” (Gardner, 2015).

A viscosidade da população ocorre quando indivíduos não dispersam longe do seu local de origem, de modo que indivíduos vizinhos tendem a ser proximamente relacionados. Assim, mesmo um comportamento social indiscriminado pode levar à seleção de parentesco (Gardner, 2015).

A seleção de parentesco também pode ocorrer quando indivíduos usam marcas ambientais ou genéticas para reconhecer quais dos seus parceiros sociais são seus parentes genealógicos, e ajustam seu comportamento de acordo com essa informação (Gardner, 2015). O reconhecimento de parentesco pode ser definido como a capacidade de verificar parentesco devido à identidade por descendência (Hamilton, 1964a, 1964b; Breed, 2014), sendo um processo interno não observável de acessar o parentesco genético, que é inferido pela discriminação de parentesco, que consiste no tratamento diferencial observado de coespecíficos baseado em marcas que variam com o parentesco (Mateo, 2015). Muitas espécies de vertebrados e invertebrados desenvolveram capacidades complexas de reconhecimento de parentesco, baseadas em marcas correlacionadas com o parentesco genético (Fletcher, 1987; Blaustein *et al.*, 1988; Sherman *et al.*, 1997; Holmes, 2004). Como outros sistemas de reconhecimento, o reconhecimento de parentesco ocorre durante um encontro entre um indivíduo que carrega a marca e um avaliador, e pode ser descrito em termos de componentes de expressão, percepção e ação (Starks, 2004). A expressão dos componentes inclui emissão ou aquisição de marcas de reconhecimento pelo portador da marca (por exemplo, marcas olfativas, sonoras e/ou visuais). A percepção dos componentes diz respeito aos mecanismos de processamento das marcas sentidas pelo avaliador (comparando as marcas com um modelo). O componente de ação foca na resposta fisiológica, de desenvolvimento e comportamental pelo avaliador (aceite/rejeição). Respostas apropriadas

dependem tanto do contexto do encontro e do nível de compatibilidade (*match*) entre marcas e moldes (Lihoreau e Rivalt, 2009). O reconhecimento pode ser baseado em associação anterior, como ocorre em organismos que aprendem as marcas de indivíduos não necessariamente relacionados durante o desenvolvimento inicial e depois discriminam esses indivíduos familiares dos não familiares, ou os organismos podem aprender seus próprios fenótipos e/ou aqueles de seus familiares, e depois comparar os fenótipos de indivíduos desconhecidos com o molde aprendido (*phenotype matching*) (Mateo, 2015).

O reconhecimento de parentesco pode ocorrer por meio de: (i) reconhecimento direto, (ii) marcas indiretas que transmitem se um receptor é um provável parente, ou (iii) uma mistura de informação direta e indireta (Leggett *et al.*, 2014). Sistemas de discriminação de parentes podem requerer forças seletivas extrínsecas para manter polimorfismos que podem ser usados como identificadores apurados no processo de reconhecimento de parentesco (Rousset e Roze, 2007; Leggett *et al.*, 2014). Sistemas parasita-hospedeiro, nos quais interações genótipo-genótipo e seleção dependente de frequência mantém variação genética, são candidatos a manterem a diversidade genética e os polimorfismos necessários para a discriminação de parentes (Leggett *et al.*, 2014).

Já o efeito barba verde é similar ao reconhecimento de parentesco, mas ocorre quando um mesmo gene (ou dois genes proximalmente ligados) codificam a marca e o comportamento social. Dois indivíduos que compartilham uma marca genética em comum podem também compartilhar genes para o comportamento social que estão ligados ao marcador, independentemente de se eles serem genealogicamente parentes próximos. O nome foi dado por Richard Dawkins (1976), que deu o exemplo hipotético de um gene que causa ao portador o crescimento de uma barba verde e a atuar altruisticamente com outros indivíduos que também tenham barba verde (Gardner, 2015).

A regra de Hamilton faz a predição geral de que, sendo outras coisas iguais, o parentesco alto é mais conducente para levar à eussocialidade, envolvendo altruísmo, do que baixo parentesco (Bourke, 2014). A eussocialidade é caracterizada por uma divisão permanente de tarefas reprodutivas, com cuidados cooperativos com a prole, castas reprodutivas e estéreis, e sobreposição de gerações entre genitores e prole (Wilson, 1971). Esse sistema de organização biológica é encontrado em Hymenoptera sociais (formigas, vespas, abelhas), em cupins (Isoptera), e no mamífero rato-toupeira-pelado (*Heterocephalus glaber*) (Bourke, 2014).

Acredita-se que algumas condições devam ser satisfeitas para que exista a possibilidade do surgimento da eussocialidade (Ribeiro, 2009). Deve haver uma situação ecológica tal que grupos de indivíduos da mesma espécie precisem viver juntos (como defender o território) e também necessidades alimentares restritas (a busca por alimento se tornar muito intensa, afetando a execução de outras tarefas) (Wilson, 2008; Ribeiro, 2009). Historicamente, muita atenção tem sido dada a hipótese da haplodiploidia para explicar a eussocialidade (Gardner, 2015). Essa hipótese prediz que operários em colônias eussociais haplodiplóides deveriam favorecer a produção de irmãs completas (com as quais elas se relacionam em 0,75, em média), do que suas próprias filhas, com as quais o parentesco é 0,50 (Breed, 2014). Porém, esse argumento não é mais usado, até mesmo porque os cupins e os ratos-toupeiras-pelados não se ajustam ao modelo da haplodiploidia, e são eussociais, e também porque existem famílias de Hymenoptera que são haplodiplóides, mas não eussociais (Nowak *et al.*, 2010). Além disso, existe também o caso de fêmeas de insetos eussociais que são fecundadas por vários machos, e nesse caso as relações de parentesco deixam de ser de 75% e passam a até menos de 30% (Ribeiro, 2009). A chave para a eussocialidade parece estar estrita a vida monogâmica, que assegura que irmãos maternos são irmãos completos, e então – em média – tão relacionados ao agente como sua própria prole (Boomsma, 2009; Gardner, 2015). Ou seja, não é necessário que o parentesco com as irmãs exceda o da prole, mas somente que equivalha ao da prole, tal que qualquer pequeno benefício de criar irmãs é suficiente para fornecer uma vantagem seletiva para a eussocialidade. Embora nem todos os organismos sociais sejam estritamente monogâmicos, exemplificado por abelhas melíferas altamente poliândricas, análises filogenéticas revelam que a monogamia é o estado ancestral de todos himenópteros eussociais e foi o sistema de acasalamento no qual a eussocialidade surgiu inicialmente (Hughes *et al.*, 2008; Gardner, 2015).

Estudos parametrizando a regra de Hamilton com dados a partir de populações naturais não são raros (como Stark, 1992; Nonacs e Reeve, 1995; Pfennig *et al.* 1999; Krakauer, 2005; Richards *et al.*, 2005) e demonstram quantitativamente que (i) o altruísmo ocorre mesmo quando a socialidade é facultativa, (ii) em muitos casos, o altruísmo está sob seleção positiva via os benefícios da aptidão indireta que excedem os custos da aptidão direta e (iii) comportamento social comumente gera benefícios indiretos por aumentar a produtividade ou sobrevivência de parentes (Bourke, 2014). Os estudos também fornecem evidências para o efeito da variabilidade ambiental, que pode alterar a direção da seleção no comportamento social, mudando os valores relativos dos custos e dos benefícios. Análises

filogenéticas comparativas dos correlatos da socialidade mostram que criação cooperativa e eussocialidade são promovidas por, além do alto parentesco e monogamia, por fatores de história de vida facilitando a estrutura familiar e altos benefícios na ajuda, além de fatores ecológicos que geram baixos custos do comportamento social (Bourke, 2014).

Entre as áreas onde a teoria da aptidão inclusiva facilita a compreensão, estão: adoção, chamados de alarme, altruísmo, canibalismo, resolução de conflito, cooperação, dispersão, divisão de trabalho, eussocialidade, discriminação de parentesco, *imprinting* genômico, multicelularidade, mutualismo, virulência de parasita, conflito pais-prole, policiamento, elementos genéticos egoístas, alocação sexual, conflito de irmãos, despeito, suicídio e simbiose. A teoria da aptidão inclusiva tem provado ser uma abordagem imensamente produtiva e útil para estudar comportamentos sociais (Gardner e West, 2014).

Entretanto, outras explicações surgiram, além da seleção de parentesco (Hamilton, 1964), para explicar o enigma da manutenção da cooperação, como as teorias do altruísmo recíproco (Trivers, 1971), dos benefícios diretos (também chamado mutualismo co-produto; Connor, 1995; West-Eberhard, 1975) e da seleção de grupo (Wynne-Edwards, 1962; Wilson, 1975; Wilson e Wilson, 2007) (Nowak, 2006; Costa, 2013; Smith, 2014). O altruísmo recíproco, introduzido por Trivers, complementa a teoria da aptidão inclusiva de Hamilton; como Dawkins coloca, a aptidão inclusiva ‘é a chave para compreender metade da cooperação altruística na natureza’, enquanto a outra metade ‘é a reciprocidade entre indivíduos não relacionados’ (Costa, 2013). Outras explicações seriam baseadas no chamado altruísmo forçado (Ribeiro, 2009): a manipulação parental (Alexander, 1974; Michener e Brothers, 1974; Alonso, 1998), por meio da qual os pais persuadem os filhos a cuidarem dos irmãos, o policiamento, que é um comportamento de inibição da atividade de reprodução de determinados operários, e a coerção, que consiste na punição do comportamento individual egoísta.

Porém, a teoria da aptidão inclusiva já sofreu críticas, especialmente com relação à eussocialidade. Alonso (1998), por exemplo, escreve que muitos comportamentos tidos como altruístas, na verdade não o são, uma vez que beneficiam o executante maximizando sua progênie; que esses comportamentos podem ser resultantes do benefício para o grupo; e que eles podem ser considerados como parte de um sistema de desenvolvimento composto de muitos indivíduos executando tarefas. Martin A. Nowak, Corina E. Tarnita, e Edward O. Wilson (2010) publicaram um artigo onde argumentaram que a teoria da aptidão inclusiva não

tem uma base sólida, sendo uma abordagem matemática particular com muitas limitações. Esses autores propõem uma teoria alternativa para explicar a evolução da eussocialidade, que consistiria nas seguintes etapas: (1) a formação de grupos; (2) a ocorrência de uma combinação mínima e necessária de características pré-adaptativas, fazendo os grupos serem bem formados. Em animais, pelo menos, a combinação inclui um ninho valioso e defensável; (3) o aparecimento de mutações que prescrevem a persistência do grupo, provavelmente pelo silenciamento do comportamento de dispersão. Um ninho durável continua a ser um elemento-chave. Eussocialidade primitiva pode emergir imediatamente devido ao gatilho das pré-adaptações; (4) traços emergentes causados pela interação dos membros do grupo são moldados pela seleção natural por forças ambientais; (5) a seleção multinível dirige mudanças no ciclo de vida da colônia e estruturas sociais. Porém, as críticas à teoria da seleção de parentesco utilizadas no artigo de Nowak *et al.* (2010), que sustentam que não há evidências empíricas da teoria da aptidão inclusiva, a necessidade de pressupostos estridentes, e o questionamento de sua base matemática, tiveram várias respostas em desacordo (Abbot *et al.*, 2011; Boomsma *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 e a validade da Regra de Hamilton. Quanto à importância da haplodiploidia na evolução da eussocialidade, já era sabido que esta pode ter tido uma importância relativamente menor. Hughes *et al.* (2008) mostraram que os clados himenópteros que se ajustam à definição padrão de eussocialidade evoluíram há muito tempo a partir de ancestrais monogâmicos. Isso implica que o alto parentesco precedeu ou coincidiu com a eussocialidade, e não que o alto parentesco surgiu depois da eussocialidade. Assim, apesar de a seleção multinível poder ocorrer, a seleção de parentesco permanece verdadeira.

O altruísmo é uma estratégia onipresente entre os organismos, de microrganismos a mamíferos (Johnson *et al.*, 2014). Há evidências empíricas de que seriam muitos os genes/alelos envolvidos no processo de reconhecer parentes, o que também é sugerido em outros trabalhos da literatura (Uyenoyama, 1981; Grosberg e Quinn, 1986; Grafen, 1990; Rousset e Roze, 2007). Thompson *et al.* (2013), em artigo intitulado “Genes underlying altruism”, descrevem um grupo de hipóteses testáveis que, total ou parcialmente, descrevem a evolução, expressão e características esperadas para genes subjacentes ao altruísmo: (i) Genes subjacentes ao altruísmo devem satisfazer a Regra de Hamilton. Altruísmo existe, e para esse tipo de comportamento evoluir, espera-se variação genética em sua base. Assim, deve haver

genes para o altruísmo (genes mostrando variação alélica que é estatisticamente associada com variação no comportamento altruísta), que são potencialmente detectáveis. (ii) Genes subjacentes ao altruísmo devem ser ambientalmente sensíveis. Se genes para o altruísmo estão evoluindo, então pelo menos alguns portadores devem se reproduzir. Essa inferência implica que genes subjacentes ao altruísmo devem ser condicionalmente expressos como uma função do seu ambiente social. (iii) Genes subjacentes ao altruísmo devem aumentar em número e complexidade com a sofisticação social-comportamental. (iv) Genes subjacentes ao altruísmo devem coevoluir com, ou depender, da evolução prévia de genes para o reconhecimento de parentesco. Os artigos de 1964 de Hamilton ressaltam a importância do parentesco e reconhecem que a evolução do altruísmo entre parentes requer mecanismos para indivíduos direcionarem a ajuda em direção aos outros portadores. Em humanos, além do aprendizado social, há trabalhos mostrando que o altruísmo promovido pelo neuropeptídeo ocitocina aumenta a percepção de relações de parentesco, pelo menos para fêmeas. (v) Genes para o altruísmo residem em regiões com baixa recombinação, exibem co-expressão e mostram arquitetura genética modular. (vi) Genes subjacentes ao altruísmo devem ser ao menos parcialmente aditivos. A evolução do altruísmo requer variação herdável, e espera-se que genes para esta e outras características sociais tenham efeitos aditivos significativos que são responsáveis pela seleção mediada por parentesco. (vii) Genes subjacentes ao altruísmo devem exibir forte pleiotropia. Pleiotropia (efeitos fenotípicos múltiplos dos alelos) devem ser fundamentais para a evolução do altruísmo, dado que eles envolvem combinações de custos e benefícios que podem ser simultaneamente fisiológicos, morfológicos, comportamentais e reprodutivos.

O reconhecimento de parentesco foi documentado em várias espécies de animais (as referências mais recentes incluem: Lizé *et al.*, 2006; Whitehorn *et al.*, 2009; Dobler e Kölliker, 2010; Mehlis *et al.*, 2010; Jongepier e Foitzik, 2016), em plantas (Dudley e File, 2007; Crepy e Casal, 2015) e também em bactérias (Stefanic *et al.*, 2015). 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 muitos trabalhos relatando sobre espécies canibais que identificam e evitam comer parentes (por exemplo, Loekle *et al.*, 1982; Pfennig *et al.*, 1993; Pfennig *et al.*, 1994; Green *et al.*, 2008; Schausberger e Croft, 2001; Schultner *et al.* 2013), incluindo insetos (por exemplo, Joseph *et al.*, 1999; Pervez *et al.*, 2005; De Nardin e Araújo, 2011; Parsons *et al.*, 2013 – neste último trabalho, verificou-se que fêmeas reprodutivas de *Tribolium confusum*

(Coleoptera) canibalizam preferencialmente ovos não aparentados, e que também diminuem a propensão ao canibalismo depois de atingirem a idade reprodutiva). Outros estudos, todavia, não encontraram evidências para discriminação baseada no parentesco (como Osawa, 1989; Hare e Eisner, 1995 e Fea *et al.*, 2014).

1.2. Do fenótipo ao genótipo: QTL, genética quantitativa e herdabilidade

A evolução de caracteres morfológicos, comportamentais e da história de vida reflete a evolução de muitos locos (Lynch e Walsh, 1998). Biólogos evolutivos buscam examinar a base genética subjacente para tais características, incluindo o número de genes afetando a característica, os efeitos relativos desses genes, e o modo de expressão que, *in toto*, constituem a arquitetura genética. O uso de marcadores genéticos para inferir a arquitetura genética é chamado análise de *locos de traços quantitativos* (QTL – *Quantitative Trait Loci*) (Erickson *et al.*, 2004).

Embora o uso de marcadores moleculares seja comum atualmente, é importante lembrar que muitas ideias importantes sobre genética foram descobertas antes de qualquer conhecimento bioquímico do modo pelo qual as características são transmitidas de pais para prole (Stram, 2014), e que a detecção de locos de caracteres quantitativos e a estimativa de parâmetros foram possíveis devido a avanços na estatística, ‘genética clássica’ ou cruzamentos complexos, e bioquímica (Weller, 2009). As visões dos primeiros geneticistas de populações, como Sax (1923) e Fisher (1935), combinadas com os avanços na genética molecular de Watson e Crick (1953), Southern (1975), Sanger *et al.* (1980) e Saiki *et al.* (1985), entre outros, trouxeram-nos para um tempo revolucionário na ciência. Esses avanços e ideias vêm permitindo transformar a biologia de uma perspectiva uma vez observacional para uma perspectiva preditiva, fazendo com que a conexão entre genótipo e fenótipo seja mais bem compreendida (Doerge, 2002).

Durante os anos 1980, a genética quantitativa foi crescentemente aplicada à evolução em populações naturais e, ao mesmo tempo, a teoria da genética quantitativa começou a ser relacionada mais diretamente a variação subjacente nos genes (Barton e Keightley, 2002). Na genética quantitativa, o valor de uma característica em um indivíduo é expresso como um desvio na média da população, e o valor de uma característica real será, normalmente, influenciado pelo ambiente do indivíduo, bem como por seu fenótipo. O fenótipo (P, do inglês

phenotype) de um indivíduo pode ser expresso como o somatório das influências ambientais (E, do inglês *environmental*) e genotípicas (G): $P = G + E$. O efeito genotípico é dividido entre efeito aditivo (A), que é o componente transmitido, e o efeito de dominância (D). Uma vez que o efeito aditivo para uma característica tenha sido estimado, essa estimativa tem, na genética quantitativa, um papel muito parecido com o do conhecimento da genética mendeliana, no caso de um ou dois locos (Ridley, 2006). Interações epistáticas entre alelos em locos diferentes podem ocorrer quando muitos locos influenciam uma característica. Interações epistáticas, assim como os efeitos de dominância, não são transmitidas para a descendência. A variabilidade na população devida a qualquer fator particular é medida pela variância. A similaridade entre parentes em geral, e entre progenitores e descendentes em particular, é governada pela variância genética aditiva da característica. A variância aditiva (V_A) costuma ser discutida como uma fração da variância fenotípica total (V_P), e é essa fração que é chamada de herdabilidade (h^2) de uma característica: $h^2 = V_A/V_P$. A herdabilidade é um número entre zero e um. Se a herdabilidade for um, toda a variância da característica é genética e aditiva (Ridley, 2006). Para muitas características de interesse econômico ou médico (ou evolutivo), as herdabilidades costumam ser menores do que 50%, frequentemente bem menos, de modo que a maioria da variação entre os indivíduos é ambiental (Kearsey, 1998).

1.3. Do fenótipo ao genótipo: QTL e marcadores moleculares

O acrônimo QTL foi primeiro cunhado por Geldermann (1975). Entretanto, o conceito subjacente é antigo, tendo se originado no início dos anos 1900 (revisado por Lynch e Walsh, 1998). Marcadores genéticos dispersos no genoma dos organismos são tipificados dentro da população de mapeamento, para os quais dados fenotípicos estão disponíveis. Se o marcador está em ligação física próxima com um QTL, os dois estarão em desequilíbrio de ligação dentro da população de mapeamento, gerando associação significativa estatisticamente entre o genótipo do marcador e a variação da característica (Slate, 2005). Ou seja, o desequilíbrio de ligação gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas apropriadas. Desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem do produto das

frequências dos alelos componentes, evidenciando uma associação significativa entre os dois locos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Marcadores genéticos representam diferenças genéticas entre organismos ou espécies. Geralmente, eles não representam os genes-alvos propriamente ditos, mas atuam como ‘bandeiras’. Marcadores genéticos que estão localizados proximamente aos genes (fortemente ligados) podem ser referidos como ‘etiquetas’ dos genes (Collard *et al.*, 2005). Tais marcadores não afetam o fenótipo da característica de interesse, porque eles estão localizados próximos ou ligados a genes controlando a característica. Todos marcadores genéticos ocupam posições genômicas específicas dentro dos cromossomos (Collard *et al.*, 2005). Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a características morfológicas. Marcadores morfológicos contribuíram para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Depois se desenvolveram marcadores isoenzimáticos, e com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Marcadores de DNA são o tipo mais usado de marcador, predominantemente devido a sua abundância (Collard *et al.*, 2005). Eles surgem a partir de diferentes classes de mutações de DNA tais como mutações de substituição (mutações de ponto), rearranjos (inserções e deleções) ou erros na replicação de DNA repetitivo em tandem (Paterson, 1996; Collard *et al.*, 2005). Esses marcadores são seletivamente neutros porque eles usualmente se localizam em regiões de DNA não codificantes. Diferente dos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores de DNA são praticamente ilimitados em número e não são afetados por fatores ambientais e/ou estágio de desenvolvimento do indivíduo (Collard *et al.*, 2005). O polimorfismo dos marcadores moleculares pode ser herdado de forma Mendeliana (Wu *et al.*, 2007). Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia com a enzima DNA polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) levou a descrição de outros marcadores, como RAPD (*random amplified polymorphic DNA*, ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e SSR (*simple sequence repeat*, ou sequências simples repetidas, também denominadas de microssatélites) (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Entre os marcadores

mais recentes destacam-se os SNPs (*single nucleotide polymorphism*, ou polimorfismo de nucleotídeo único), os EST (*expressed sequence tags*, ou marcador de sequência expressa) (Erickson *et al.*, 2004) e RADseq (*restriction-site associated DNA sequencing*, ou sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição) (Davey *et al.*, 2011). Marcadores polimórficos podem ser descritos como codominantes ou dominantes. Essa discriminação é baseada em se os marcadores podem diferenciar entre homozigotos e heterozigotos. As diferentes formas de um marcador de DNA são chamadas ‘alelos’(Collard *et al.*, 2005).

Dentre os marcadores moleculares acima citados, destacam-se dois, AFLP e SSR, que vem sendo bastante utilizados (como em Moen *et al.*, 2004; Jiggins *et al.*, 2005; Tobler *et al.*, 2005; Kapan *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2009; Pino Del Carpio *et al.*, 2011; Dadras *et al.*, 2014).

Polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) são bastante usados em estudos evolutivos, de genética populacional e de conservação em plantas, animais e micro-organismos. Aplicações desses marcadores são particularmente úteis em espécies não-modelo, para os quais nenhuma sequência de DNA está disponível, e onde outros marcadores *genome-wide*, tais como SNPs, são difíceis de obter (revisado por Caballero *et al.*, 2013). Marcadores AFLP têm um baixo custo relativo a outros marcadores. Então, marcadores AFLP vêm sendo úteis para muitos objetivos, como mapeamento *genome-wide*, diversidade genética populacional, estudos de hibridização e introgressão, análises filogenéticas, e detecção de assinaturas de seleção. Mais recentemente, marcadores de DNA associados com sítios de restrição (RAD) foram sugeridos como ferramenta alternativa para alguns dos objetivos acima, embora problemas importantes também afetem esse tipo de marcador (revisado por Caballero *et al.*, 2013). A análise de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Conforme descrito por Ferreira e Gratapaglia (1995), na primeira etapa o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e uma de corte frequente. Uma enzima de corte raro reconhece de 6 a 8 pares de bases ou uma sequência rara de bases (por exemplo, *EcoRI*), e a enzima de corte frequente reconhece 4 pares de bases (por exemplo, *MseI*). Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores. Os *primers* utilizados são construídos de tal forma que, além de conterem a sequência específica de 20 a 25 nucleotídeos complementares à sequência dos adaptadores, contêm ainda de 1 a 3 nucleotídeos adicionais de sequência

arbitrária na sua extremidade 3'. A seleção via PCR é feita em duas etapas: uma seleção branda com apenas uma base arbitrária, utilizando *primers* não marcados (amplificação pré-seletiva), e uma seleção final com 3 bases arbitrárias e o *primer* para o terminal de corte raro marcado com radioisótopo (ou fluorescência). Uma ação seletiva ocorre no momento em que é realizada a PCR e somente uma subpopulação de fragmentos é amplificada. A quarta etapa consiste na visualização da subpopulação de fragmentos amplificados, através de gel de alta resolução, ou através de analisadores genéticos automáticos (Ferreira e Gratapaglia, 1995).

Com relação aos microssatélites, regiões contendo sequências simples repetidas (SSR) são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases), complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite (Ferreira e Gratapaglia, 1995). Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada *ilha microssatélite*, independentemente do elemento repetido, constitui um loco genético altamente variável e multialélico. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Locos SSRs parecem ser somaticamente estáveis, possuem expressão codominante (ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados), e possuem muitos alelos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser identificados e diferenciados (Ferreira e Gratapaglia, 1995). Microssatélites podem ter até 70 ou 80 alelos para um único loco (Wu *et al.*, 2007). Os SSR são muito frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A maior limitação da tecnologia de microssatélites é o trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores (Ferreira e Gratapaglia, 1995). Outra limitação é que eles raramente são transferíveis entre espécies (Hall *et al.*, 2010a). Em Lepidoptera, a obtenção de locos de microssatélites é desafiadora e difícil (Zhang, 2004), embora ao redor de 20 marcadores SSR tenham sido descritos para *Heliconius erato* e *H. melpomene* (Flanagan *et al.*, 2002; Jiggins *et al.*, 2005; Mavárez and González, 2006; Kapan *et al.*, 2006).

1.4. Do fenótipo ao genótipo: estudos de associação e análises de ligação

Com relação aos princípios genéticos por trás do mapeamento genético de QTL, a metodologia inclui duas áreas principais: análises de ligação e estudos de associação (Olson *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002). Tanto mapeamentos de ligação como mapeamentos por associação usam desequilíbrio de ligação entre os marcadores moleculares e locos funcionais para ligar a variação das características fenotípicas com a variação nos marcadores moleculares (Flint-Garcia *et al.*, 2003). A diferença entre as duas abordagens é que o método de mapeamento de ligação usa o desequilíbrio de ligação gerado a partir de um *design* de cruzamento envolvendo dois pais, enquanto o mapeamento de associação usa o desequilíbrio de associação histórico que está presente nas populações, relacionados por ancestrais comuns (Gebhardt *et al.*, 2014). Ao contrário dos estudos de ligação que sempre requerem famílias, estudos de associação são conduzidos usando múltiplas abordagens amostrais (Rao, 2008). Os termos ligação e desequilíbrio de ligação são frequentemente confundidos. Embora desequilíbrio de ligação e ligação sejam relacionados, eles são distintos. Ligação se refere à herança correlacionada de locos através da conexão em um cromossomo, enquanto o desequilíbrio de ligação se refere à correlação entre alelos em uma população. A confusão ocorre porque uma forte ligação pode resultar em altos níveis de desequilíbrio de ligação (Flint-Garcia *et al.*, 2003).

Historicamente, análises de ligação vêm sendo usadas para medir a proximidade genética entre locos, e também para mapear QTL. As populações de mapeamento costumam ser altamente estruturadas, com pedigrees conhecidos (como populações F₂ ou linhagens endocruzadas). Essas populações, entretanto, têm algumas limitações: o número limitado de eventos de recombinação resulta em uma resolução pobre para características quantitativas, apenas dois alelos de um dado loco podem ser estudados simultaneamente (Flint-Garcia *et al.*, 2003). Além disso, esses estudos requerem grandes tamanhos amostrais, e podem apenas mapear aquelas diferenças capturadas entre as linhagens parentais iniciais. Porque é improvável que essas linhagens contenham alelos segregantes de grande efeito de cada loco contribuindo para a variação em populações naturais, particularmente em linhagens endocruzadas, alguns locos podem permanecer indetectados (Miles e Wayne, 2008). Além disso, alelos específicos que segregam, particularmente em linhagens endocruzadas, podem não ser relevantes para populações naturais. Entretanto, outros alelos desses mesmos locos serão provavelmente de interesse. Então, o objetivo de muitos estudos é identificar locos antes que alelos particulares (Miles e Wayne, 2008). Três métodos são amplamente utilizados para

detectar QTLs: análise de um único marcador, mapeamento por intervalo simples, e mapeamento por intervalo composto (Collard *et al.*, 2005).

Por explorar uma genealogia profunda, e não pedigrees de famílias, o mapeamento de associação oferece algumas vantagens sobre o mapeamento de ligação: maior resolução de mapeamento, mais alelos avaliados, referência populacional mais ampla e menos tempo para estabelecer uma associação (Gebhardt *et al.*, 2014). Diferente de populações de mapeamento de ligação, o desequilíbrio de ligação em populações de mapeamento por associação pode não ser influenciado apenas por recombinação, mas também por outras forças (Flint-Garcia *et al.*, 2003; Gebhardt *et al.*, 2014). As forças influenciando o padrão e a extensão do desequilíbrio de ligação são: tipo de cruzamento, deriva genética, seleção, mutação, subestrutura populacional e parentesco, e viés de averiguação. Para muitas populações de mapeamento, a importância desses fatores é desconhecida ou pode ser apenas grosseiramente estimada. Dois tipos de experimentos de mapeamento por associação podem ser estimados: experimentos baseados em famílias, e experimentos baseados em população (Gebhardt *et al.*, 2014).

1.5.O reconhecimento de parentesco e os sinais químicos

Segundo Martin *et al.* (2008), o reconhecimento é uma das funções mais básicas que qualquer organismo necessita executar. A capacidade para reconhecer uma espécie diferente, o sexo dos coespecíficos, família, ou membro da colônia, subjaz quase todos os comportamentos. Marcas visuais e sonoras são geralmente usadas por vertebrados, enquanto os invertebrados, especialmente insetos, empregam reconhecimento predominantemente químico (Howard, 1993). A seleção natural deve favorecer o uso de marcas que otimizem a discriminação, porque erros de reconhecimento – rejeitar um coespecífico desejável ou aceitar um indivíduo indesejável – diminuem os benefícios esperados das interações entre parentes (Lehmann e Perrin, 2002). Marcas de reconhecimento em insetos sociais e outros animais são primariamente químicas na natureza e percebidas por quimiorrecepção do olfato e ou contato (Vásquez *et al.* 2008).

A arquitetura genética das marcas de reconhecimento varia imensamente entre diferentes grupos (revisado por Helantera *et al.*, 2011), a partir de sistemas de reconhecimento baseado em alelos de, por exemplo, mofos-de-lodo, invertebrados marinhos e fungos

(Benabentos *et al.*, 2009; Nicotra *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2010b), os efeitos das proteínas urinárias principais (MUPS), locos do complexo principal de histocompatibilidade MHC e o *background* genético nos odores de reconhecimento em mamíferos (Kwak *et al.*, 2006; Willse *et al.*, 2006; Cheetham *et al.*, 2007) até sistemas de insetos sociais. Em invertebrados, polimorfismos genéticos nas enzimas envolvidas na biossíntese de semioquímicos podem ser importantes. Por exemplo, a diversidade olfatória pode resultar da ação de desaturases ou elongases que modificam os semioquímicos baseados em hidrocarbonetos (Thomas e Simmons, 2011). Segundo Helantera *et al.* (2011), esta variação através dos taxa não é importante apenas para compreender o comportamento social na geração atual, mas também as marcas da seleção (Crozier e Dix, 1979; Crozier, 1986; Rousset e Roze, 2007) e a estabilidade do comportamento social ao longo do tempo (Gardner e West, 2007).

Os insetos exercem as relações ecológicas envolvidas na comunicação com o ambiente e com os outros organismos de diversas maneiras, sendo aquela mediada por compostos químicos bastante importante (Lima Mendonça *et al.*, 2014). Esses compostos, chamados de sinais químicos ou semioquímicos são, provavelmente, a mais antiga forma de comunicação encontrada nos organismos vivos, e os insetos constituem um grupo de animais que utilizam e dependem destes compostos em diversas etapas do seu comportamento reprodutivo e de sobrevivência no habitat. Os sinais químicos utilizados pelos insetos são divididos em dois grupos: os aleloquímicos, que compreendem as substâncias envolvidas na comunicação interespecífica e atuam no processo de busca pelo alimento, e os feromônios, que têm ação intraespecífica (Lima Mendonça *et al.*, 2014).

Segundo Schal *et al.* (1998), a cutícula dos insetos é um complexo de fibrilas de quitina em uma matriz de proteínas, na qual músculos, traqueias, e canais alimentares estão ancoradas, e contra a qual a pressão hidrostática pode ser exercida pela hemolinfa. Uma camada lipídica epicuticular cobre a superfície externa da cutícula nos insetos. Hidrocarbonetos (CHCs), primariamente n-alcenos, alcenos, e compostos metil-ramificados são os compostos epicuticulares mais comuns. Suas funções, conforme revisado por Schal *et al.* (1998), mostradas experimentalmente ou inferidas, são muitas. As características hidrofóbicas dos hidrocarbonetos contribuem significativamente para o balanço d'água, primariamente por retardar a perda d'água, mas também por manter a água fora dos espiráculos. A epicutícula também serve como mensageiro químico (semioquímicos, infoquímicos). Em insetos, hidrocarbonetos servem como feromônios que medeiam interações intraespecíficas, cairomônios que medeiam interações predador-presa e parasitóide-

hospedeiro, e alomônios que funcionam na defesa. Hidrocarbonetos têm função no mimetismo químico e camuflagem. Hidrocarbonetos específicos têm sido relacionados à mediação do reconhecimento de plantas por insetos: a superfície de hidrocarbonetos das plantas são um importante determinante em sua aceitabilidade para alimentação ou oviposição para insetos fitófagos. Em interações tritróficas a superfície química das plantas, em combinação com o perfil de hidrocarbonetos dos insetos hospedeiros pode determinar a aceitabilidade dos insetos hospedeiros para predadores e parasitóides. Os hidrocarbonetos cuticulares também representam a primeira barreira para a entrada de patógenos, servindo também como caimônios para fungos e bactérias entomopatogênicos cuja aderência à superfície cuticular depende da distinção mediada por hidrocarbonetos entre hospedeiros e não hospedeiros. Os hidrocarbonetos cuticulares podem também constituir uma matriz física para a liberação lenta de feromônios de insetos. Hidrocarbonetos constituem uma barreira física contra parasitas e predadores. As propriedades hidrofóbicas e lubrificantes dos hidrocarbonetos podem também facilitar ou prejudicar a capacidade dos insetos obterem uma base em superfícies lisas. Apesar do papel diverso que os hidrocarbonetos desempenham nas interações inseto-inseto e inseto-plantas, pouco é conhecido sobre os mecanismos sensoriais de transdução para os estímulos de hidrocarbonetos (Schal *et al.*, 1998).

Investigações bioquímicas mostraram que os insetos são capazes de sintetizar a maioria dos hidrocarbonetos. Então, a composição dos hidrocarbonetos cuticulares é um reflexo do genótipo do inseto e tem potencial para uso na taxonomia (Martin *et al.*, 2008). Entre os insetos, aqueles que são verdadeiramente eussociais possuem o mais avançado e complexo sistema de comunicação química conhecido. Mais de 100 glândulas exócrinas foram descritas em insetos sociais, com mais da metade sendo encontrada em formigas (Martin *et al.*, 2008). Eles são altamente diversos e variáveis, e os perfis de hidrocarbonetos cuticulares têm um componente herdável (Thomas e Simmons, 2008; Weddle *et al.*, 2013). Isso é importante para a capacidade de discriminar até indivíduos não familiares baseado no parentesco, onde o próprio fenótipo pode ser usado como molde para o qual o fenótipo do parceiro potencial é comparado (Pusey e Wolf, 1996; Mateo e Johnston, 2003; Fischer *et al.* 2015)

A síntese de hidrocarbonetos ocorre nos oenócitos dos insetos, e os produtos são então transportados para a cutícula (e outros tecidos) por proteínas lipoforinas (Tsutsui, 2013). Schal *et al.* (1998) concluíram que os hidrocarbonetos internos em muitos insetos foram qualitativamente similares aos hidrocarbonetos da superfície. Eles sugeriram que os hidrocarbonetos internos podem ser reservatórios de hidrocarbonetos nos oenócitos,

epiderme, hemolinfa, corpos de gordura e/ ou gônadas. Os oenócitos dos insetos podem ser associados com tecido epidérmico ou tecidos periféricos de corpos de gordura. A glândula pós-faríngea é a estrutura glandular mais estudada com respeito ao conteúdo de hidrocarbonetos em formigas (Bagnères e Blomquist, 2010).

Os hidrocarbonetos cuticulares de muitas espécies de insetos são extremamente complexos e envolvem misturas de componentes normal, mono, di e tri-insaturados e mono, di, tri, tetra e pentametil-ramificados (Blomquist e Bagnères, 2010). Hidrocarbonetos de insetos atingem comprimento de cadeia de 11 a 43 carbonos, tendo tanto números ímpares como pares de átomos e carbono (Singer, 1998). O número de compostos conhecidos é muito grande, e o número de isômeros possíveis é muito maior (Blomquist e Bagnères, 2010).

Um exemplo de especificidade na deposição de hidrocarbonetos ocorre em vários lepidópteros, nos quais feromônios de cadeia curta ou hidrocarbonetos precursores de feromônios (Schal *et al.*, 1998; Jurenka *et al.*, 2003) são sintetizados por oenócitos, e então co-transportados pela lipoforina com os componentes de cadeia longa destinados a ser hidrocarbonetos cuticulares. Os feromônios de cadeia curta ou hidrocarbonetos precursores de feromônios são seletivamente transportados para a glândula de feromônio, enquanto os hidrocarbonetos cuticulares tornam-se distribuídos sobre a cutícula (Jurenka *et al.*, 2003; Blomquist, 2010). Wang *et al.* (2016) mostraram que em insetos sociais, os perfis de operários e alados da espécie de formiga carnívora australiana *Iridomyrmex purpureus* variam entre diferentes partes do corpo.

Segundo Blomquist e Bagnères (2010), os compostos cuticulares mais comuns, além dos hidrocarbonetos, incluem uma variedade de tipos de ésteres, ácidos graxos livres, álcoois primários e secundários, cetonas e esteróis. Triacilgliceróis e fosfolipídios mais polares não são componentes comuns dos lipídios cuticulares dos insetos. Em alguns casos, hidrocarbonetos são hidroxilados e metabolizados para compostos oxigenados, e esses produtos incluem alguns dos feromônios de contato e de curto alcance da mosca doméstica (Blomquist, 2003) e da barata germânica (Schal *et al.*, 2003; Blomquist e Bagnères, 2010). Embora alguns autores tenham argumentado que outros semioquímicos sejam importantes como marcas para reconhecimento de colônias, a maioria conclui que os hidrocarbonetos cuticulares são os mais importantes (Howard e Blomquist, 2005).

O papel dos hidrocarbonetos cuticulares como sinais para o reconhecimento de espécies, parentesco e parceiros foi mostrado em numerosos insetos sociais (Lahav *et al.*, 1998; Howard e Blomquist, 2005; Dani, 2006), bem como em muitos insetos solitários, incluindo *Drosophila* (Ferveur, 2005), grilos dos gêneros *Laupala* (Mullen *et al.*, 2007) e

Gryllus (Tregenza e Wedell, 1997), moscas tse-tse *Glossina* (Carlson *et al.*, 2005), e besouros (Peschke, 1987; Page *et al.*, 1990; Johansson e Jones, 2007, Stoeffler *et al.*, 2007) (South 2008).

1.6. *Heliconius erato phyllis*: organismo de estudo

Borboletas estão entre os insetos mais carismáticos, e sua variação de cores têm fascinado os cientistas por séculos (Papa *et al.*, 2013). Borboletas *Heliconius* tiveram sua radiação pelo neotrópico nos últimos 17 milhões de anos, diversificando em 40 espécies e muitas subespécies e raças (Nadeau *et al.*, 2011). Estão distribuídas do México às Américas Central e do Sul. Estão adaptadas a altitudes que vão do nível do mar a 1600 m, e são frequentemente encontradas voando em pastagens abertas em florestas perturbadas e de crescimento secundário (DeVries, 1987; Hay-Roe *et al.*, 2008). Possuem notáveis padrões aposemáticos nas asas, com coloração marrom, preta, vermelha, laranja e amarela, que alertam potenciais predadores para sua impalatabilidade (Kapan, 2001; Ferguson e Jiggins, 2009). O gênero *Heliconius* é bastante diversificado em termos de diferenciação racial, mimetismo mülleriano intraespecífico e riqueza de espécies (Brown, 1981; Beltrán *et al.*, 2007; Cardoso e Gilbert, 2013).

A característica mais distinta comum aos *Heliconius*, mas ausente em outros gêneros de heliconiíneos, ou qualquer gênero de borboletas, é a alimentação de pólen pelos adultos, e a reorganização correlacionada de como larva e adultos alocam recursos de nitrogênio para a reprodução (Gilbert, 1972,1975; Dunlap-Pianka *et al.*, 1977; Boggs, 1981) (Cardoso e Gilbert, 2013). Gilbert (1991) propôs que a inovação da alimentação por pólen forneceu uma nova zona adaptativa para a radiação de *Heliconius*, mas como os recursos adquiridos pelo adulto poderiam abastecer a diversificação não é óbvio (Cardoso e Gilbert, 2013). O aumento de aminoácidos devido ao consumo de pólen poderia ter permitido a evolução da impalatabilidade, visto que os compostos defensivos de *Heliconius*, os glicosídeos cianogênicos, são derivados de aminoácidos (Zagrobelny *et al.*, 2008; Cardoso e Gilbert, 2013). Assim, o aumento da defesa química dos adultos possibilitaria a expansão e diversificação do gênero sob mimetismo mülleriano intragênero (Gilbert, 1991; revisado por Cardoso e Gilbert, 2013).

Muitas espécies de *Heliconius* foram observadas formando dormitórios comunais, nos quais os adultos repetidamente se reúnem em um local particular no dormitório à noite. As

borboletas chegam a seus dormitórios em torno de três horas antes do pôr do sol, e saem dentro de duas horas após o nascer do sol. Os dormitórios são geralmente formados por coespecíficos, mas algumas vezes diferentes espécies repousam juntas. A evolução do comportamento de repouso comunal em *Heliconius* seria facilitada pela impalatabilidade, taxa reprodutiva lenta, área de vida aprendida limitada e longevidade devido ao consumo de pólen (revisado por Finkbeiner *et al.*, 2012). Os adultos vivem de 90 a 180 dias (Brown, 1992; Dell’Erba *et al.*, 2005). Uma das maneiras de explicar a impalatabilidade e comportamentos agressivos é a seleção de parentesco. Muitas espécies impalatáveis usam padrões de coloração conspícuos para dar um sinal claro (aposematismo) aos predadores de sua toxicidade, e em muitos casos a mensagem pode ser reforçada através de agregações (Salcedo, 2011).

Segundo Beltrán *et al.* (2007), entre os heliconiíneos, há lagartas gregárias (quando no mínimo há dez ovos ou larvas juntos), solitárias e aquelas que geralmente colocam ovos solitários, mas que ocasionalmente colocam alguns poucos ovos juntos. O comportamento gregário das lagartas evoluiu pelo menos três vezes a partir de um ancestral solitário (Beltrán *et al.*, 2007). Outra característica não usual entre alguns *Heliconius* é um comportamento de acasalamento único, conhecido como cruzamento pupal. Os machos visitam as pupas fêmeas por dias sucessivos, até a proximidade da eclosão, e sentam sobre a pupa fêmea um dia antes da emergência, e o cruzamento ocorre na manhã seguinte, antes que a fêmea tenha emergido completamente (Gilbert, 1976; Beltrán *et al.*, 2007).

Heliconius tem se tornado um organismo modelo para estudos de ecologia, evolução, e comportamento, levando Turner (1977) a declarar que eles são “os mais bem estudados invertebrados terrestres sem importância econômica, além de *Drosophilidae*” (Kronforst e Papa, 2015). Embora isso não continue assim hoje (pois há muitas pesquisas com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, por exemplo), há um recente esforço de muitos pesquisadores internacionais para caracterizar os genes subjacentes ao mimetismo do padrão das asas em *Heliconius*, e então usar essa informação para responder questões fundamentais em biologia evolutiva (Kronforst e Papa, 2015).

Estudos de marcação-e-recaptura de *Heliconius* mostraram que as populações permanecem bastante estáveis ao longo do tempo, usualmente em baixas densidades. Depois de um breve período de dispersão, os adultos de *Heliconius* se estabelecem em áreas onde eles permanecem pelo resto de suas vidas (Mallet, 1986; Moura *et al.*, 2011). Então, as populações de *Heliconius* estão organizadas em unidades moderadamente sedentárias, com pouca movimentação dos indivíduos, aparentemente como resultado do comportamento de manutenção de áreas de vida (*home range*). Esses comportamentos sugerem que o fluxo

gênico entre populações geograficamente separadas é baixo (Mallet, 1986; Moura *et al.*, 2011). Moura *et al.* (2011) examinaram a diversidade genética e diferenciação entre populações de *Heliconus erato* e *H. melpomene*, em porção nordeste da Mata Atlântica brasileira, para estimar o impacto potencial da fragmentação de habitat na conectividade da população em borboletas com comportamento de *home-range*. Os autores encontraram substancial diferenciação genética entre populações e diferenças intrigantes entre espécies e entre marcadores moleculares, refletindo a biologia de populações única desse sistema de estudo e seu contexto geográfico.

Cada indivíduo explora sua própria área de vida, a qual corresponde, em média, a um círculo imaginário de raio entre 100 e 500 m, contados a partir do dormitório comunal (Endringer *et al.*, 2004). No interior de sua área de vida, os principais recursos são memorizados, o que permite sua constante visitação. Para ambos os sexos, tais pontos de atração são representados por flores específicas e pelas plantas hospedeiras das lagartas da espécie. O néctar e pólen que servem de alimento aos indivíduos adultos são extraídos das flores, especialmente de espécies pertencentes às famílias Verbenaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae e Asteraceae (Endringer *et al.*, 2004). As plantas hospedeiras (Passifloraceae) se constituem nos locais de oviposição da espécie, as quais servirão de alimento aos estágios imaturos, as quais são constantemente inspecionadas pelas fêmeas adultas. Já os machos patrulham tais plantas à procura de fêmeas recém-eclodidas da pupa, aptas à cópula (Endringer *et al.*, 2004). Estudos em campo sobre *Heliconius* geralmente revelam um padrão composto por vida longa, reprodução contínua e aprendizagem para localização dos recursos durante o dia, caso se reúnam em dormitórios à noite (Brown, 1981; Turner, 1981; Endringer *et al.*, 2004).

O gênero *Heliconius* vem sendo estudado nos últimos anos sob vários aspectos, como evolução e desenvolvimento (Joron *et al.*, 2006; Ferguson e Jiggins, 2009; Aymoné *et al.*, 2011; Aymoné *et al.*, 2013); genômica (Papanicolaou, 2008; Counterman *et al.*, 2010), seleção natural e sexual (Estrada e Jiggins, 2008; Cardoso *et al.*, 2009; Klein e Araújo, 2010; Klein e Araújo, 2013), conservação de populações naturais (Moura *et al.*, 2011), morfometria tradicional e geométrica (Borges *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2011), comportamento (Klein e Araújo, 2010; De Nardin e Araújo, 2011), biogeografia evolutiva (Cardoso, 2010), especiação (Jiggins *et al.*, 2008), mimetismo (Cuthill e Charleston, 2015; Mérot *et al.* 2015). Merrill *et al.* (2015) resumiram os principais avanços nas pesquisas em *Heliconius* nos últimos 150 anos: evidências experimentais para seleção positiva dependente de frequência, mantendo padrões aposemáticos locais na natureza, fornecendo um excelente exemplo de adaptação local

mantida por forte seleção natural; evidências de amplo fluxo gênico através da barreira de espécies; descoberta de transferência horizontal dos alelos do padrão de coloração permitindo introgressão adaptativa, e evidência que isso pode levar ao isolamento reprodutivo e especiação de características híbridas; identificação dos principais genes envolvidos nas mudanças miméticas, e a demonstração de homologia entre genes de padrão de coloração através de *Heliconius* distantemente relacionados bem como de outros Lepidoptera. Também se demonstrou que inversões cromossômicas estão associadas com a evolução de supergenes; evidências para o papel chave da evolução de genes regulatórios (em oposição à divergência de sequências codificantes) em gerar diversidade morfológica, e evidências experimentais que as colorações de advertência são “características mágicas” (que são características sob seleção ecológica divergente as quais contribuem para o acasalamento não aleatório, e que hipoteticamente facilitam a especiação com fluxo gênico). Esse resumo evidencia que, apesar de diversas áreas onde *Heliconius* é o objeto de estudo, a área com mais pesquisas atualmente é relacionada ao mimetismo e padrão de coloração.

A borboleta extra-amazônica *Heliconius erato phyllis* (Figura 1) é a mais difundida, ocorrendo em diversos biomas e, embora cada indivíduo use uma única planta hospedeira como fonte de alimento durante o desenvolvimento, diferentes indivíduos podem usar muitas plantas hospedeiras do gênero *Passiflora* (Brown e Mielke, 1972). Estudos mostraram que *H. erato phyllis* é altamente seletivo com respeito aos locais de oviposição, com relação a partes e espécie da planta, conteúdo de nitrogênio e presença de coespecíficos (Williams e Gilbert, 1981; Mugrabi-Oliveira e Moreira, 1996; Rodrigues e Moreira, 1999, 2002; Kerpel *et al.*, 2006; revisado por Jorge *et al.*, 2011). As larvas de *H. erato* têm um comportamento solitário, e podem ser canibais (Benson *et al.*, 1976). 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. Lagartas de *H. erato phyllis* podem discriminar ovos irmãos de não-aparentados, de modo que a frequência de canibalismo de ovos irmãos é significativamente inferior à frequência de canibalismo de ovos não aparentados (De Nardin e Araújo, 2011). Entretanto, não foi observada discriminação de parentesco entre lagartas (De Nardin *et al.*, 2015).



Figura 1 - *Heliconius erato phyllis*: A: ovo (dimensões aproximadas: 1,5 mm de altura e 0,9 mm de diâmetro); B: lagarta de 1º estágio em *Passiflora suberosa*; C: adulto.

Objetivos

Objetivo Geral

Estudar aspectos relacionados ao reconhecimento de parentesco observado em imaturos de *Heliconius erato phyllis*.

Objetivos Específicos

- 1) Elucidar a herança do reconhecimento de parentesco, através da estimativa de herdabilidade do comportamento não-canibal. **(Capítulo 2)**

- 2) Uma vez que o córion do ovo é o meio pelo qual as lagartas reconhecem seus parentes, avaliar a natureza molecular da informação coriônica, ou o perfil químico do córion, bem como das lagartas recém-eclodidas. **(Capítulo 3)**

- 3) Verificar se há associação entre os marcadores moleculares (AFLP e SSR) e os fenótipos comportamentais relacionados ao reconhecimento de parentesco, bem como nos casos de canibalismo. **(Capítulo 4)**

- 4) Avaliar as proles geradas nos cruzamentos realizados no Capítulo 2 quanto aos efeitos do endocruzamento na mortalidade geral e em variáveis do desenvolvimento, como modo de avaliar possíveis consequências colaterais do reconhecimento de parentesco nas populações. **(Capítulo 5)**

Referências

- Abbot P, Abe J, Alcock J, Alizon S, Alpedrinha JAC, Andersson M, Andre JB, van Baalen M, Balloux F, Balshine S, Barton, N, Beukeboom LW, et al. (2011) Inclusive fitness theory and eusociality. *Nature* 471: E1-E4. doi:10.1038/nature09831.
- Alexander RD (1974) The evolution of social behavior. *Annu Rev Ecol Syst* 5:325-83.
- Alonso WJ (1998) The role of kin selection theory on the explanation of biological altruism: a critical review. *J Comp Biol* 3(1):1-14.
- Aymoné ACB, Valente VLS and Araújo AM (2013) Ultrastructure and morphogenesis of the wing scales in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae): What silvery/brownish surfaces can tell us about the development of color patterning? *Arthropod Struct Dev* 42 (5): 349-442. doi:10.1016/j.asd.2013.06.001.
- Aymoné ACB, Lothhammer N, Valente VLS and Araújo AM (2014) Embryogenesis of *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae): A contribution to the anatomical development of an evo-devo model organism. *Develop Growth Differ* 56(6): 448-459 doi: 10.1111/dgd.12144.
- Bagnères AG and Blomquist GJ (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In: Blomquist GJ and Bagnères AG (eds) *Insect hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, New York, pp 75-99.
- Barton NH and Keightley PD (2002) Understanding quantitative genetic variation. *Nat Rev Genet* 3:11-21. doi:10.1038/nrg700.
- Baxter S, McMillan O, Chamberlain N, French-Constant RH and Jiggins C (2009) Prospects for locating adaptive genes in lepidopteran genomes *A case study of butterfly color patterns*. In: Goldsmith MR and Marec F (eds) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera (Contemporary Topics in Entomology Series)*. CRC Press, Boca Raton, pp 105-120.
- Beltrán M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E and 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.

- Benabentos R, Hirose S, Sugang R, Curk T, Katoh M, Ostrowski EA, Strassmann JE, Queller DC, Zupan B, Shaulsky G and Kuspa A (2009) Polymorphic members of the lag gene family mediate kin discrimination in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 19:567–572.
- Benson WW, Brown KS and Gilbert LE (1976) Coevolution of plant and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29(4): 659-680.
- Blaustein AR, Porter RH and Breed MD (1988) Special issue: kin recognition in animals: empirical evidence and conceptual issues. *Behav Genet* 18:405–564.
- Blomquist GJ (2003) Biosynthesis and ecdysteroid regulation of housefly sex pheromone production. In: Blomquist GJ and Vogt RG (eds) *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology – The Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles*. Elsevier, London, pp 231–252.
- Blomquist GJ (2010) Biosynthesis of cuticular hydrocarbons. In: Blomquist GJ and Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* Cambridge University Press, New York, pp 35-52.
- Blomquist GJ and Bagnères AG (2010) Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In: Blomquist GJ and Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, New York, pp 3-18.
- Boggs CL (1981) Selection pressures affecting male nutrient investment at mating in heliconiine butterflies. *Evolution* 35: 931–940.
- Boomsma JJ (2009) Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos Trans R Soc Lond B* 364: 3191–3207. doi:10.1098/rstb.2009.0101.
- Boomsma JJ, Beekman M, Cornwallis CK, Griffin AS, Holman L, Hughes WHO, Keller L, Oldroyd BP and Ratnieks FLW (2011) Only full-sibling families evolved eusociality. *Nature* 471: E4-E5. doi:10.1038/nature09832.
- Borges EO, Faccioni-Heuser MC and 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* 278:3313–3320. doi:10.1098/rspb.2011.1465.
- Bourke AFG (2014) Hamilton's rule and the causes of social evolution. *Phil Trans R Soc B* 369: 20130362. doi:10.1098/rstb.2013.0362
- Breed MD (2014) Kin and nestmate recognition: the influence of W.D. Hamilton on 50 years of research. *Anim Behav* 92:271-279. doi:10.1016/j.anbehav.2014.02.030.

- Brown Jr. KS (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annu Rev Entomol* 26:427-456.
- Brown Jr. KS (1992) Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. *In*: Morellato, LPC (ed) *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Campinas, Unicamp/ Fapesp. p.142-187.
- Brown Jr. KS and 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.
- Caballero A, García-Pereira MJ and Quesada H (2013) Genomic distribution of AFLP markers relative to gene locations for different eukaryotic species. *BMC Genomics* 14:528.
- 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 and Gilbert LE (2009) Prenuptial agreements: mating frequency predicts gift-giving in *Heliconius* species. *Entom Experim Appl* 131:109–114.
- Cardoso MZ and Gilbert LE (2013) Pollen feeding, resource allocation and the evolution of chemical defence in passion vine butterflies. *J Evol Biol* 26(6):1254-60. doi: 10.1111/jeb.12119.
- Carlson DA, Mramba F, Sutton BD, Bernier UR, Geden CJ and Mori K (2005) Sex pheromone of the tsetse species, *Glossina austeni*: isolation and identification of natural hydrocarbons, and bioassay of synthesized compounds. *Med Vet Entomol* 19:470–479.
- Charnov EL (1977) An elementary treatment of the genetical theory of kin selection. *J Theor Biol* 66:541–550.
- Cheetham SA, Thom MD, Jury F, Ollier WER, Beynon RJ and Hurst JL (2007) The genetic basis of individual-recognition signals in the mouse. *Curr Biol* 17:1771.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB and Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-1685.
- Connor RC (1995) Altruism among non-relatives: alternatives to the ‘Prisoner’s Dilemma’. *Trends Ecol Evolut* 10: 84-86.
- Costa JT (2013) Hamiltonian inclusive fitness: a fitter fitness concept. *Biol Lett* 9: 20130335. doi:10.1098/rsbl.2013.0335.

- 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 and McMillan WO (2010) Genomic hotspots for adaptation: the population genetics of mullerian mimicry in *Heliconius erato*. PLOS Genetics 6(2):e1000796.
- Crepny MA and Casal JJ (2015) Photoreceptor-mediated kin recognition in plants. New Phytol 205:329-338. doi: 10.1111/nph.13040.
- Crozier RH (1986) Genetic clonal recognition abilities in marine invertebrates must be maintained by selection for something else. Evolution 40:1100–1101.
- Crozier RH and Dix MW (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. Behav Ecol Sociobiol. 4:217–224.
- Cuthill e Charleston (2015) Wing patterning genes and coevolution of Müllerian mimicry in *Heliconius* butterflies: support from phylogeography, co-phylogeny and divergence times. Evolution 69(12):3082-96. doi: 10.1111/evo.12812.
- Dadras AR, Sabouri H, Nejad GM, Sabouri A and Shoai-Deylami M (2014) Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. Mol Biol Rep (2014) 41:3317–3329. doi: 10.1007/s11033-014-3194-6.
- Dani FR (2006) Cuticular lipids as semiochemicals in paper wasps and other social insects. Ann Zool Fenn 43:500–514.
- Darwin C (1859) On the origin of species by means of natural selection. London, U.K.: J. Murray.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM and Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. Nat Rev Genet 12:499-510. doi:10.1038/nrg3012.
- Dawkins R (1976) The selfish gene. Oxford, UK: Oxford University Press.
- De Nardin J and Araújo AM (2011) Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). J Ethol 29:499–503.
- De Nardin J, Missaggia BO and Araújo AM (2015) An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures. Ethol Ecol Evol 27:294–305. doi: 10.1080/03949370.2014.946539.
- Dell’Erba R, Kaminski LA and Moreira GRP (2005) O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Série Zoologia, 95(1):29-46.

- DeVries P (1987) Butterflies of Costa Rica and their natural history. Princeton University Press, New Jersey, 456 pp.
- Dobler R e Kölliker M (2010) Kin-selected siblicide and cannibalism in the European earwig. *Behav Ecol* 21:257-263.
- Doerge RJ (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 3:43-52.
- Dudley SA e File AL (2007) Kin recognition in an annual plant. *Biol Lett* 3:435-438.
- Dunlap-Pianka H, Boggs CL and Gilbert LE (1977) Ovarian dynamics in Heliconiine butterflies: programmed senescence versus eternal youth. *Science* 197: 487–490.
- Endringer FB, Silva PR and Lutz LV (2004) Hipóteses evolutivas sobre a origem e manutenção dos dormitórios comuns de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Natureza on line* 2(1):1–9.
- Erickson DL, Fenster CB, Stenøien HK and Price D (2004) Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Mol Ecol* 13:2505–2522. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02254.x.
- Estrada C and 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.
- Fea MP, Stanley MC and Holwell GI (2014) Cannibalistic siblicide in praying mantis nymphs (*Miomantis caffra*). *J Ethol* (2014) 32:43–51. doi: 10.1007/s10164-013-0391-z.
- Ferguson LC and Jiggins CD (2009) Shared and divergent expression domains on mimetic *Heliconius* wings. *Evol Develop* 11:498-512.
- Ferreira ME and Grattapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3rd edition. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. (EMBRAPA-CENARGEN.Documentos, 20).
- Ferriere R and Michod RE (2011) Inclusive fitness in evolution. *Nature* 471: E6-E8. doi:10.1038/nature09834.
- Ferveur JF (2005) Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behav Genet* 35:279–295.
- Finkbeiner SD, Briscoe AD and Reed RD (2012) The benefit of being a social butterfly communal roosting deters predation. *Proc R Soc B* 279(1739):2769-2776. doi: 10.1098/rspb.2012.0203

- Fischer K, Karl I Heuskin S, Janowitz S and Dötterl S (2015) Kin recognition and inbreeding avoidance in a butterfly. *Ethol* 121:1–8. doi: 10.1111/eth.12410
- Fisher R (1930) *The genetical theory of natural selection*. Oxford, Clarendon.
- Fisher R (1935) *The Design of Experiments* 3rd edition. Oliver & Boyd, London.
- Flanagan NS, Blum MJ, Davison A, Alamo M, Albarrán R, Faulhaber K, Peterson E and McMillan WO (2002) Characterization of microsatellite loci in neotropical *Heliconius* butterflies. *Mol Ecol Notes* 2:398-401.
- Fletcher DJC and Michener CD (1987) *Kin recognition in animals*. Wiley, New York.
- Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM and Buckler ES (2003) Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J* 44:1054–1064. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02591.x
- Frank SA (1998) *Foundations of Social Evolution*. Princeton University Press, Princeton.
- Freeman S and Herron JC (2009) Seleção de parentesco e comportamento social. In: Freeman S and Herron JC (eds) *Análise Evolutiva*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre, pp 447-482.
- Gardner A (2015) Kin selection. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, 2nd edition, pp 26–31. doi: 10.1016/B978-0-08-097086-8.81009-0
- Gardner A and West SA (2007) Social Evolution: the decline and fall of genetic kin recognition. *Curr Biol* 17(18):810-812.
- Gardner A and West SA (2014) Inclusive fitness: 50 years on. *Phil Trans R Soc B* 369: 0130356. doi: 10.1098/rstb.2013.0356
- Gebhardt C, Urbany C and Stich B (2014) Dissection of potato complex traits by linkage and association genetics as basis for developing molecular diagnostics in breeding programs. In: Tuberosa R, Graner A, Frison E (eds) *Genomics of Plant Genetic Resources. Volume 2. Crop Productivity, Food Security and Nutritional Quality*. Springer, Dordrecht, pp 47- 85. doi: 10.1007/978-94-007-7575-6
- Geldermann H (1975) Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor Appl Genet* 46:319–330.
- Gilbert LE (1972) Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:1403–1407.
- Gilbert LE (1975) Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert LE and Raven PH (eds) *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin, pp 210–240.

- Gilbert LE (1976) Postmating female odour in *Heliconius* butterflies: a male contributed anti-aphrodisiac? *Science* 193:419–420.
- Gilbert LE (1991) Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: Price P, Lewinsohn TM, Fernandes GW and Benson WW (eds) *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley & Sons, New York, pp 403–427.
- Grafen A (1990) Do animals really recognise kin? *Anim Behav* 39:42-54.
- Green WW, Mirza RS and Pyle GG (2008) Kin recognition and cannibalistic behaviours by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Naturwissenschaften* 95: 269-272.
- Grosberg RK and Quinn JF (1986) The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. *Nature* 322: 456-459.
- Haldane JBS (1932) *The causes of evolution*. London, Longmans, Green and Company.
- Hall D, Tegstrom C and Ingvarsson PK (2010a) Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Briefings in functional genomics* 9(2):157-165. doi:10.1093/bfgp/elp048
- Hall C, Welch J, Kowbel DJ, Glass NJ (2010b) Evolution and diversity of a fungal self/nonself recognition locus. *PLoS One*. 5:e14055. doi:10.1371/journal.pone.0014055
- Hamilton WD (1964a) Genetical evolution of social behavior. I. *J Theor Biol* 7: 1-16.
- Hamilton WD (1964b) Genetical evolution of social behavior. II. *J Theor Biol* 7:17-52.
- Hare JF and Eisner T (1995) Cannibalistic caterpillars (*Utetheisa ornatrix*; Lepidoptera: Arctiidae) fail to differentiate between eggs on the basis of kinship. *Psyche* 102:27-33.
- Hay-Roe MM (2008) Races of *Heliconius erato* (Nymphalidae: Heliconiinae) found on different sides of the Andes show wing size differences. *Fla Entomol* 91(4): 711-712.
- Helanterä H, Lee YR, Drijfhout FP and Martin SJ (2011) Genetic diversity, colony chemical phenotype, and nest mate recognition in the ant *Formica fusca*. *Behav Ecol* 22:710-716. doi:10.1093/beheco/arr037.
- Herre EA and Wcislo WT (2011) In defence of inclusive fitness theory. *Nature* 471:E8-E9. doi:10.1038/nature09835.
- Holmes WG (2004) The early history of Hamiltonian-based research on kin recognition. *Ann Zool Fennici* 41:691-711.

- Howard RW (1993) Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Samuelson DW, Nelson DR, eds. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. Lincoln, NE: University of Nebraska Press, 179–226.
- Howard R and Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50: 371–393.
- Hughes WOH, Oldroyd BP, Beekman M and Ratnieks FLW (2008) Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science* 320: 1213–1216. doi:10.1126/science.1156108.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltrán M, McMillan WO, Johnston JS and Bermingham E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171:557–570. doi: 10.1534/genetics.104.034686.
- Jiggins CD, Salazar C, Linares M and Mavarez J (2008) Hybrid trait speciation in *Heliconius* butterflies. *Phil Trans R Soc B* 363:3047–3054.
- Johansson BG and Jones TM (2007) The role of chemical communication in mate choice. *Biol Rev* 82:265–289.
- Johnson AE, Goldsby HJ, Ofria C and Goings S (2014) The evolution of kin inclusivity levels. *Gecco 2014 – Proceedings of the 2014 Genetic and Evolutionary Computation Conference* 177–184. doi:10.1145/2576768.2598283.
- Jongepier E and Foitzik S (2016) Ant recognition cue diversity is higher in the presence of slavemaker ants. *Behav Ecol* 27(1): 304–311. doi:10.1093/beheco/arv153.
- Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP and Freitas ALV (2011) Hostplant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biol J Linn Soc* 102:765–774.
- Joron M, Papa R, Beltran M, Chamberlain N, Mavárez J, Baxter S, Abanto M, Bermingham E, Humphray SJ, Rogers J, Beasley H, Barlow K, ffrench-Constant RH, Mallet J, McMillan WO and Jiggins CD (2006) A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in *Heliconius* butterflies. *PLoS Biology* 4:e303. doi: 10.1371/journal.pbio.0040303.
- Joseph SB, Snyder WE and Moore AJ (1999) Cannibalizing *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) larvae use endogenous cues to avoid eating relatives. *J Evol Biol* 12:792–797.
- Jurenka RA, Subchev M, Abad J-L, Choi M-J and Fabrias G (2003) Sex pheromone biosynthetic pathway for disparlure in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:809–814.

- Kapan DD (2001) Three-butterfly system provides a field test of Mullerian mimicry. *Nature* 409:338–340. doi:10.1038/35053066.
- Kapan DD, Flanagan NS, Tobler A, Papa R, Reed RD, Gonzalez JA, Restrepo MR, Martinez L, Maldonado K, Ritschoff C, Heckel DG, McMillan WO (2006) Localization of Müllerian mimicry genes on a dense linkage map of *Heliconius erato*. *Genetics* 173:735–757. doi: 10.1534/genetics.106.057166 .
- Kearsey MJ (1998) The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *J Exp Bot* 49(327):1619–1623.
- Kerpel SM, Soprano E and Moreira GRP (2006) Effect of nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and consequences for larval performance and oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Neotropical Entomology* 35:192–200.
- Klein AL and 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.
- Klein AL and Araújo AM (2013) Sexual size dimorphism in the color pattern elements of two mimetic *Heliconius* butterflies. *Neotrop Entomol* 42:600- 606. doi: 10.1007/s13744-013-0157-x.
- Krakauer AH (2005) Kin selection and cooperative courtship in wild turkeys. *Nature* 434:69-72.
- Kronforst MR and Papa R (2015) The functional basis of wing patterning in *Heliconius* butterflies: the molecules behind mimicry. *Genetics* 200:1–19. doi: 0.1534/genetics.114.172387.
- Kwak J, Willse A, Preti G, Curran M, Wahl JH, Yang P, Yamazaki K and Beauchamp G. (2006) Background strain dependence of MHC related odorants. *Chem Senses* 31:A93–A93.
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A and Vander Meer RK (1998) Nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*: do queens matter? *Behav Ecol Sociobiol* 43:203– 212.
- Leggett HC, Brown SM and Reece SE (2014) War and peace: social interactions in infections. *Phil Trans R Soc B* 369:20130365. doi:10.1098/rstb.2013.0365.
- Lehmann L and Perrin N (2002) Altruism, dispersal, and phenotype-matching kin recognition. *Am Nat* 159:451-468.
- Lihoreau M and Rivault C (2009) Kin recognition via cuticular hydrocarbons shapes cockroach social life. *Behav Ecol* 20(1):46–53. doi: 10.1093/beheco/arn113.

- Lima-Mendonça A, Lima Mendonça A, Sant'Ana AEG and Do Nascimento RR (2014) Semioquímicos de moscas das frutas do gênero *Anastrepha*. *Quim Nova* 37(2):293-301.
- 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 Sci* 273:2381-2386.
- Loekle DM, Madison DM and Christian JJ (1982) Time dependency and kin recognition of cannibalistic behaviour among Poeciliid fishes. *Behav Neural Biol* 35:315-318.
- Lynch M and Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp 431-533.
- Mallet J (1986) Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behaviour: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia* 68:210-217.
- Martin SJ, Helanterä H and Drijfhout FP (2008) Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. *Biol J Linnean Soc* 95:131-140.
- Mateo JM (2015) Perspectives: Hamilton's Legacy: mechanisms of kin recognition in humans. *Ethology* 120:1-9. doi: 10.1111/eth.12358.
- Mateo JM and Johnston RE (2003) Kin recognition by self referent phenotype matching: weighing the evidence. *Anim Cogn* 6: 73-76.
- Mavárez J and González M (2006) A set of microsatellite markers for *Heliconius melpomene* and closely related species. *Mol Ecol Notes* 6:20-23.
- Maynard Smith J (1964) Group selection and kin selection. *Nature* 201:1145-1147. doi:10.1038/2011145a0.
- Mehlis M, Bakker TCM, Engqvist L and 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 Sci* 277:2627-2635.
- Mérot C, Frérot B, Leppik E and Joron M (2015) Beyond magic traits: multimodal mating cues in *Heliconius* butterflies. *Evolution*:1-14. doi:10.1111/evo.12789.
- Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak KM, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RWR and Yu Q (2015) The diversification of *Heliconius* butterflies: What have we learned in 150 years? *J Evol Biol* 28(8):1417-38. doi: 10.1111/jeb.12672.
- Michener CD and Brothers DJ (1974) Were workers of eusocial Hymenoptera initially altruistic or oppressed? *Proc Nat Acad Sci USA* 71:671-4.

- Moen T, Fjalestad KT, Munck H and Gomez-Raya L (2004) A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics* 167: 851–858. doi: 10.1534/genetics.103.013227.
- Moura PA, Quek SP, Cardoso MZ and Kronforst MR (2011) Comparative population genetics of mimetic *Heliconius* butterflies in an endangered habitat; Brazil's Atlantic Forest. *BMC Genetics* 12:9.
- Mugrabi-Oliveira E and Moreira GRP (1996) Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Rev Bras Zool* 13:939-953.
- Mullen SP, Mendelson TC, Schal C and Shaw KL (2007) Rapid evolution of cuticular hydrocarbons in a species radiation of acoustically diverse Hawaiian crickets (Gryllidae: Trigonidiinae: Laupala). *Evolution* 61: 223-231.
- Nadeau NJ, Whibley A, Jones RT, Davey JW, Dasmahapatra KK, Baxter SW, Quail MA, Joron M, French-Constant RH, Blaxter ML, Mallet J and Jiggins CD (2011) Genomic islands of divergence in hybridizing *Heliconius* butterflies identified by large-scale targeted sequencing. *Phil Trans R Soc B* 367:343–353. doi:10.1098/rstb.2011.0198.
- Nicotra ML, Powell AE, Rosengarten RD, Moreno M, Grimwood J, Lakkis FG, Dellaporta SL and Buss LW (2009) A hypervariable invertebrate allodeterminant. *Curr Biol* 19:583–589.
- Nonacs P and Reeve HK (1995) The ecology of cooperation in wasps: causes and consequences of alternative reproductive decisions. *Ecology* 76(3): 953-967.
- Nowak MA, Tarnita CE and Wilson EO (2010) The evolution of eusociality. *Nature* 466: 1057-1062. doi:10.1038/nature09205.
- Nowak MA (2006) Five rules for the evolution of cooperation. *Science* 314: 1560-1563.
- Olson JM, Witte JS and Elston RC (1999) Tutorial in biostatistics genetic mapping of complex traits. *Stat Med* 18: 2961-2981.
- 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.
- Page M, Nelson LJ, Haverty MI and Blomquist GJ (1990) Cuticular hydrocarbons of eight species of North American cone beetles, *Conophthorus* Hopkins. *J Chem Ecol* 16:1173-1198.
- Papa R, Kapan DD, Counterman BA, Maldonado K, Lindstrom DP, Reed RR, Nijhout HF, Hrbek T and McMillan WO (2013) Multi-Allelic major effect genes interact with minor

- effect QTLs to control adaptive color pattern variation in *Heliconius erato*. PLoS ONE 8(3): e57033. doi:10.1371/journal.pone.0057033.
- Papanicolaou A, Gebauer-Jung S, Blaxter ML, MacMillan WO and Jiggins CD (2008) ButterflyBase: a platform for lepidopteran genomics. Nucleic Ac Res 36:D582-D587.
- Parsons W, Zhong W and Rudolf VHW (2013) Mating status and kin recognition influence the strength of cannibalism. Anim Behav 85: 365-369. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.11.006
- Paterson AH (1996) Making genetic maps. In: Paterson AH (ed) Genome Mapping in Plants, R. G. Landes Company, Austin, pp 23–39.
- Pervez A, Gupta AK and Omkar (2005) Kin recognition and avoidance of kin cannibalism by the larvae of co-occurring ladybirds: a laboratory study. Eur J Entomol 102: 513–518.
- Peschke K (1987) Cuticular hydrocarbons regulate mate recognition, male aggression, and female choice of the rove beetle, *Aleochara curtula*. J Chem Ecol 13:1993-2008.
- Pfennig DW, Reeve HK and Sherman PW (1993) Kin recognition and cannibalism in spadefoot toad tadpoles. Anim Behav 46:87-94.
- Pfennig DW, Sherman PW and Collins J P (1994) Kin recognition and cannibalism in polyphenic salamanders. Behav Ecol 5:225-232.
- Pfennig DW, Collins JP and Ziemba RE (1999) A test of alternative hypotheses for kin recognition in cannibalistic tiger salamanders. Behav Ecol 10:436-443.
- Pino Del Carpio D, Basnet RK, De Vos RCH, Maliepaard C, Paulo MJ and Bonnema G (2011) Comparative methods for association studies: a case study on metabolite variation in a *Brassica rapa* core collection. PLoS ONE 6(5):e19624. doi:10.1371/journal.pone.0019624.
- Pusey A and Wolf M (1996) Inbreeding avoidance in animals. Trends Ecol Evol 11: 201-206.
- Rao DC (2008) An overview of the genetic dissection of complex traits. In: Rao DC and Gu CC (eds) Genetic dissection of complex traits. 2nd edition. Academic Press, San Diego, pp 3 – 34.
- Ribeiro PL (2009) Insetos eusociais e o desafio para a ideia da seleção natural. Rev Biol 3:1-8.
- Richards MH, French D and Paxton RJ (2005) It's good to be queen: classically eusocial colony structure and low worker fitness in an obligately social sweat bee. Mol Ecol 14:4123–4133. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02724.x
- Ridley M (2006) *Evolução*. 3rd edition. Artmed, Porto Alegre, 752 pp.
- Rodrigues D and Moreira GRP (1999) Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. J Lepid Soc 53:108-113.

- Rodrigues D and 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 and Roze D (2007) Constraints on the origin and maintenance of genetic kin recognition. *Evolution* 61:2320-2330.
- Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS and Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr Sci* 90 (5): 683-689.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Salcedo C (2011) Evidence of predation and disturbance events at *Heliconius* (Insecta: Lepidoptera: Nymphalidae) nocturnal aggregations in Panama and Costa Rica. *J Nat Hist* 45: 1715–1721.
- Sanger F, Nilken S and Coulson AR (1980) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5468 (1980).
- Sax K (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552–560.
- Schal C, Sevala VL, Young HP and Bachmann JAS (1998) Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons—cuticle and ovary as target tissues. *Amer Zool* 38: 382-393.
- Schal C, Fan Y and Blomquist, GJ (2003). Regulation of pheromone biosynthesis, transport, and emission in cockroaches. In: Blomquist GJ and Vogt RG (eds) *Insect Pheromone Biosynthesis and Molecular Biology: The Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles*. Elsevier, Amsterdam, pp 283–322.
- Schausberger P and Croft BA (2001) Kin recognition and larval cannibalism by adult females in specialist predaceous mites. *Anim Behav* 61:459–464.
- Sherman PW, Reeve HK and Pfennig DW (1997) Recognition systems. In: Krebs JR, Davies NB (eds) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell, Oxford, pp 69-98.
- Schultner E, d’Ettorre P and Helanterä H (2013) Social conflict in ant larvae: egg cannibalism occurs mainly in males and larvae prefer alien eggs. *Behav Ecol* 24:1306–1311. doi:10.1093/beheco/art067.
- Singer TL (1998) Roles of hydrocarbons in the recognition systems. *Amer Zool* 38:394-405.

- Slate J (2005) Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. *Mol Ecol* 14:363–379. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02378.x.
- Smith JE (2014) Hamilton's legacy: kinship, cooperation and social tolerance in mammalian groups. *Anim Behav* 92:291-304. doi:10.1016/j.anbehav.2014.02.029.
- South A, LeVan K, Leombruni L, Orians CM and Lewis SM (2008) Examining the role of cuticular hydrocarbons in firefly species recognition. *Ethol* 114:916–924. doi: 10.1111/j.1439-0310.2008.01535.x.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503–517.
- Stark RE (1992) Cooperative nesting in the multivoltine large carpenter bee *Xylocopa sulcatipes* Maa (Apoidea: Anthophoridae): Do Helpers Gain or Lose to Solitary Females? *Ethology* 91:301-310.
- Starks PT (2004) Recognition systems: from components to conservation. *Ann Zool Fenn* 41:689–690.
- Stefanic P, Kraigher B, Lyons NA, Kolter R and Mandic-Mulec I (2015) Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(45): 14042–14047, doi: 10.1073/pnas.1512671112.
- Stoeffler M, Maier TS, Tolasch T and Steidle JLM (2007) Foreign-language skills in rove-beetles? Evidence for chemical mimicry of ant alarm pheromones in myrmecophilous *Pella* beetles (Coleoptera: Staphylinidae). *J Chem Ecol* 33:1382-1392.
- Stram DO (2014) Design, analysis, and interpretation of genome-wide association scans. Springer, New York, 344 pp.
- Strassmann JE, Page Jr RE, Robinson GE and Seeley TD (2011) Kin selection and eusociality. *Nature* 471: E5-E6. doi:10.1038/nature09833.
- Thomas ML and Simmons LW (2008) Cuticular hydrocarbons are heritable in the cricket *Teleogryllus oceanicus*. *J Evol Biol* 21:801-806.
- Thomas ML and Simmons LW (2011) Crickets detect the genetic similarity of mating partners via cuticular hydrocarbons. *J Evol Biol* 24: 1793–1800. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02319.x.
- Thompson GJ, Hurd PL and Crespi BJ (2013) Genes underlying altruism. *Biol Lett* 9:20130395. doi:10.1098/rsbl.2013.0395.

- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E, Jiggins CD, Johnston JS, Heckel DG and McMillan WO (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94:408–417.
- Tregenza T and Wedell N (1997) Definitive evidence for cuticular pheromones in a cricket. *Anim Behav* 54: 979—984.
- Trivers RL (1971) The Evolution of Reciprocal Altruism. *Quart Rev Biol* 46:35-57.
- Tsutsui ND (2013) Dissecting ant recognition systems in the age of genomics. *Biol Lett* 9: 20130416. doi:10.1098/rsbl.2013.0416
- Turner JRG (1977) A bibliography of *Heliconius* and the related genera. SUNY-Stony Brook, Stony Brook, New York, *Progr Ecol Evol, Contrib* 151, 21 pp.
- Turner JRG (1981) Adaptation and evolution in *Heliconius*: A defense of neoDarwinism. *Annu Rev Ecol Syst* 12:99–121.
- Uyenoyama MK, Feldman MW and Mueller LD (1981) Population genetic theory of kin selection: multiple alleles at one locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5036-5040.
- Vásquez GM, Schal C and Silverman J (2008) Cuticular hydrocarbons as queen adoption cues in the invasive Argentine ant. *J Exp Biol* 211:1249-1256. doi:10.1242/jeb.017301.
- Wang Y, Kaftanoglu O, Fondrk MK and Page Jr. PE (2014) Nurse bee behaviour manipulates worker honeybee (*Apis mellifera* L.) reproductive development. *Anim Behav* 92:253-261. doi:10.1016/j.anbehav.2014.02.012.
- Wang Q, Goodger JQD, Woodrow IE, Elgar MA (2016) Location-specific cuticular hydrocarbon signals in a social insect. *Proc R Soc B* 283:20160310. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.0310>.
- Watson JD and Crick FH (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964–967.
- Weddle CB, Steiger S, Hamaker CG, Ower GD, Mitchell C, Sakaluk SK and Hunt J (2013) Cuticular hydrocarbons as a basis for chemosensory self-referencing in crickets: a potentially universal mechanism facilitating polyandry in insects. *Ecol Lett* 16:346-353.
- Weller JI (2009) Quantitative trait loci analysis in animals. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, 287 pp.
- West-Eberhard MJ (1975) The evolution of social behavior by kin selection. *Q Rev Biol* 50:1-33.
- Williams KS and Gilbert LE (1981) Insects as selective agents on plant vegetative morphology – egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science* 212:467–469.

- Willse A, Kwak J, Yamazaki K, Preti G, Wahl JH and Beauchamp GK (2006) Individual odor types: interaction of MHC and background genes. *Immunogenetics* 58:967–982.
- Wilson EO (1971) *Insect societies*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press.
- Wilson DS (1975) Theory of group selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:143-146.
- Wilson EO (2008) One giant leap: How insects achieved altruism and colonial life. *Bioscience* 58:17-25.
- Wilson DS and Wilson EO (2007) Rethinking the theoretical foundation of sociobiology. *Q Rev Biol* 82:327-348.
- Whitehorn PR, Tinsley MC and Goulson D (2009) Kin recognition and inbreeding reluctance in bumblebees. *Apidologie* 40:627–633. doi: 10.1051/apido/2009050
- Wu R, Ma CX and Casella G. (2002) Joint linkage and linkage disequilibrium mapping of quantitative trait loci in natural populations. *Genetics* 160:779–792.
- Wu R, Ma CX and Casella G (2007) *Statistical genetics of quantitative traits-linkage, maps, and QTL*. Springer, New York. 369 pp.
- Wynne-Edwards VC (1962) *Animal dispersion in relation to social behaviour*. Oliver & Boyd, Edinburgh, UK.
- Zagrobelny M, Bak S and Møller BL (2008) Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* 69:1457–1468.
- Zhang DX (2004) Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol Evol* 19(10):507-509.

CAPÍTULO 2

Kin recognition in a butterfly: inferences about its heritability

JANAÍNA DE NARDIN, LUCIANA DA SILVA e

ALDO M. ARAÚJO

Ethology Ecology & Evolution, 2016

DOI:10.1080/03949370.2016.1146801

(Aceito em 20 de janeiro de 2016)

CAPÍTULO 3

A first survey of the chemistry for kin recognition in the butterfly

Heliconius erato phyllis

JANAÍNA DE NARDIN, ALEXSANDRO DALLEGRAVE,

TÂNIA MARA PIZZOLATO E ALDO MELLENDER DE ARAÚJO

Submetido ao periódico *Insect Science*.

CAPÍTULO 4

Associação entre marcadores moleculares e fenótipos relacionados ao reconhecimento de parentesco em uma borboleta: um estudo preliminar

JANAÍNA DE NARDIN, VANESSA BUFFON,
LUIS FERNANDO REVERS E ALDO MELLENDER DE ARAÚJO

Artigo em preparação.

CAPÍTULO 5

Comparative effects of inbreeding and outbreeding on the ontogeny of

***Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)**

JANAÍNA DE NARDIN, LUCIANA DA SILVA e

ALDO M. ARAÚJO

Entomological Science

DOI: 10.1111/ens.12203

(Aceito em 08 de novembro de 2015)

CAPÍTULO 6

Discussão Geral

Síntese dos resultados

Esta tese buscou uma melhor compreensão de aspectos relacionados ao reconhecimento de parentesco observado em imaturos de *Heliconius erato phyllis*, avaliado através da frequência de canibalismo lagarta-ovo. Os principais resultados encontrados aqui foram:

(i) O reconhecimento de parentesco, avaliado pelo não-canibalismo de ovos irmãos, parece ter um componente herdável. Independentemente do comportamento apresentado pelos pais, proles oriundas de pais irmãos têm, em média, frequência de canibalismo de ovos irmãos significativamente inferior àquela observada em proles oriundas de pais não-aparentados. Sugerimos que a herança do reconhecimento de parentesco seja quantitativa, dependendo de muitos genes, além de fatores ambientais. Para a expressão do fenótipo comportamental de não-canibalismo, seria necessário ser atingido um limiar.

(ii) O perfil químico de lagartas recém-eclodidas e de ovos difere quantitativamente para vários compostos, embora qualitativamente seja bastante semelhante. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre famílias para vários compostos, tanto em córions como em lagartas recém-eclodidas. Alguns compostos diferiram entre famílias apenas nas amostras de córion, outros apenas nas amostras de lagartas, e outros compostos diferiram para ambos os materiais.

(iii) Foram encontradas algumas associações entre marcadores moleculares AFLPs e SSRs e os fenótipos comportamentais avaliados, nos dois delineamentos experimentais adotados. Este estudo é preliminar, mas corrobora que o reconhecimento de parentesco tem a contribuição de muitos locos para sua expressão.

(iv) Foi observada depressão endogâmica para algumas características relacionadas à história de vida, como peso da pupa, tamanho do adulto e sobrevivência ao

longo do desenvolvimento, mas não para tempo de desenvolvimento, e nem características morfológicas, como peso e volume dos ovos. Visto que existe reconhecimento de parentesco, e a dispersão da espécie é baixa, espera-se que indivíduos aparentados acasalem nas populações naturais. Logo, a estimativa de quão severa pode ser a depressão endogâmica é importante.

Discussão

Inicialmente, ao observar lagartas canibais de *Heliconius erato phyllis* na natureza, e que embora as borboletas ovipositem preferencialmente individualmente, ovos podem ser encontrados na mesma planta hospedeira, buscamos verificar se havia reconhecimento de parentesco lagarta-ovo. Assim, em De Nardin e Araújo (2011) mostramos que, havendo escolha entre canibalizar um ovo irmão e um não-parente, a frequência de canibalismo de não-parentes (66%) foi significativamente superior a frequência de canibalismo de ovos irmãos (34%). Quando apenas ovos irmãos estavam disponíveis, a frequência de canibalismo foi de 53%, enquanto que foi de 83% quando apenas ovos não-parentes estavam disponíveis (estes valores também diferiram estatisticamente). A continuidade dessa pesquisa, na minha dissertação de mestrado (De Nardin, 2012), buscou por diferenças em variáveis do desenvolvimento entre lagartas canibais de ovos irmãos e lagartas não-canibais, como modo de estimar custos e benefícios dos comportamentos canibal (egoísta) e não-canibal (altruísta). Os resultados mostraram que houve diferenças significantes para volume e peso do ovo (ovos de canibais foram maiores do que de não-canibais), 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). Não houve diferença na mortalidade entre canibais e não-canibais, 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. Ou seja, 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. Uma segunda abordagem adotada no mestrado foi buscar onde estava o sinal utilizado para o reconhecimento de parentesco. Observamos que as lagartas de diferentes ínstaes não se tratavam diferencialmente conforme o parentesco, considerando vários comportamentos (indiferença, fuga, ataque, hostilidade e canibalismo). Lagartas de primeiro ínstar, mantidas juntas e com alimento em abundância, também não exibiram comportamento diferencial com relação a parentes, de modo que a frequência de canibalismo entre lagartas de primeiro ínstar irmãs e não-irmãs não diferiu. Outro teste realizado foi avaliar a frequência de canibalismo entre meio-irmãos (por parte de pai, já que as fêmeas dessa espécie são monândricas), e observou-se que a frequência de canibalismo entre lagarta-ovo foi de 83,7%, não diferindo da frequência observada para não parentes (De Nardin *et al.*, 2015). Assim, visto que há reconhecimento lagarta-ovo entre irmãs (De Nardin e Araújo, 2011), e não há discriminação entre lagartas, é provável que o sinal usado no reconhecimento esteja no córion do ovo, que é de origem materna. Esse trabalho deu origem ao capítulo 4 dessa tese, onde buscamos avaliar a natureza da informação química.

Outra abordagem, também iniciada no mestrado, foi a da herança do reconhecimento de parentesco. Nosso objetivo ao realizar os cruzamentos entre indivíduos de diferentes comportamentos, apresentados no capítulo 2, era avaliar se existia herança para o canibalismo. Ao avaliar o comportamento das proles, entretanto, observamos que o que parecia ser herdado era o reconhecimento de parentesco, avaliado pela frequência de não canibalismo. Esses dados iniciais originaram as perguntas para a presente tese.

O reconhecimento de parentesco, estritamente definido como a capacidade de inferir parentesco devido à identidade por descendência (Hamilton, 1964a, 1964b), tem definições mais amplas, que incluem comportamentos que refletem a classificação de outros como membros ou não-membros de um grupo social, considerando que os membros de um grupo social são parte de uma mesma família estendida (Sherman *et al.*, 1997; Breed, 2014). O processo de reconhecer parentes depende da presença de marcas ou sinais que contenham informação sobre a identidade genética do animal. O estudo do reconhecimento de parentesco inclui compreender essas marcas bem como entender a informação fenotípica usada pelo receptor, como é acessada a informação, e como as respostas comportamentais do receptor são modificadas em resposta à informação (Sherman, *et al.*, 1997; Mateo, 2004; Breed, 2014).

Reconhecimento individual conta com variação fenotípica substancial nas marcas usadas para reconhecimento: tais marcas são algumas vezes chamadas hipervariáveis. Marcas associadas com MHC (*major histocompatibility complex*) são hipervariáveis. Exemplos de marcas de reconhecimento que são ao menos subjetivamente hipervariáveis incluem, conforme revisado por Breed (2014), faces dos primatas (Marechal, *et al.* 2010; Platek *et al.* 2008), canto de aves (Yorzinski *et al.*, 2006), padrões de coloração na cutícula de vespas papel (Tibbetts e Dale, 2007), odores de mamíferos (Swaisgood *et al.*, 1999; Johnston, 2003; Mateo, 2003, 2004; Brennan e Kendrick, 2006;), vocalizações de lobos-marinhos (Insley, 2000), hidrocarbonetos de superfície em baratas (Lihoreau e Rivault, 2009) e abelhas melíferas (Breed e Buchwald, 2008). Um animal pode perceber seu próprio fenótipo e usar esta informação para tentar identificar parentes que são idênticos por descendência e fazer distinções entre parentes baseado no grau de parentesco. A teoria do auto-referenciamento já foi discutida em vários trabalhos, como Mateo e Johnston (2000, 2003) e Hain e Neff (2007). Estudos apontam que artrópodes podem usar hidrocarbonetos cuticulares para auto-referenciamento (Sherman, 1991; Neff e Sherman, 2003; Lihoreau e Rivault, 2009). Anfíbios (Villinger e Waldman, 2008), peixes (Thunken *et al.*, 2009) e mamíferos (Hain e Neff, 2006; Mateo, 2010) também podem se auto-referenciar. Em plantas, também ocorre auto-referenciamento mediado geneticamente, através de auto-incompatibilidade (Takayama e Isogai, 2005) (revisado por Breed, 2014). Breed *et al.* (1995) mostrou que os operários de *Apis mellifera* são capazes de discriminar entre favos com base na similaridade genética aprendida. Essas marcas são aprendidas rapidamente (em cinco minutos ou menos) e transferidas entre as abelhas, através de contato físico. Nos testes comportamentais aqui realizados, o tempo para cada lagarta entrar em contato com os ovos presentes no teste foi de 45 minutos.

Além da posse de marcas fenotípicas hipervariáveis, há outros elementos necessários para fazer uma discriminação fina baseada na identidade por descendência, como as capacidades neurobiológicas e sensoriais para perceber e utilizar a informação consubstanciada nas marcas. Reeve (1989) desenvolveu um modelo de limiar que pode ser ajustado dependendo das circunstâncias ecológicas; os custos e benefícios de fazer a discriminação podem mudar, e o modelo de limiar dá um modo de medir como mudanças ambientais de curto-prazo podem afetar o nepotismo ou outras interações sociais mediadas pelo reconhecimento de parentesco (Breed, 2014).

Vários trabalhos sugerem que seriam muitos os genes envolvidos no reconhecimento de parentesco (Uyenoyama, 1981; Grosberg e Quinn, 1986; Grafen, 1990; Rousset e Roze, 2007). Se os indivíduos se beneficiam em produzir marcas distintas, nós podemos esperar diferenças individuais herdáveis. Também podemos esperar que quando indivíduos se beneficiam da discriminação entre parentes e não parentes, essa variação herdável será selecionada (Jones e Ransome, 1993; Scherrer e Wilkinson, 1993; Blumstein *et al.*, 2013).

A presente tese corrobora que o reconhecimento de parentesco é herdável e é resultante da ação de vários locos (Capítulos 2 e 4). Além disso, que existem diversos compostos químicos na superfície de ovos e lagartas, que variam quantitativamente entre famílias, que teriam potencial de fazer parte do processo de reconhecimento (Capítulo 3). Essas marcas químicas poderiam constituir parte da informação utilizada no processo de reconhecimento, que também envolveria sua percepção, e posteriormente a ação tomada pelo indivíduo que percebeu essas marcas.

Adultos de *Heliconius* se estabelecem em áreas onde permanecem pelo resto de suas vidas, após um breve período de dispersão, sendo que o período de maior dispersão ocorre antes da primeira captura, em experimentos de marcação-recaptura (Mallet, 1986). As populações, dessa forma, são unidades moderadamente sedentárias, de modo que os indivíduos se movimentam pouco, aparentemente como resultado do comportamento de *home-range* (Ramos e Freitas, 1999). Tal comportamento pode ser observado nas rotas de forrageio únicas dos indivíduos, que retornam diariamente para as plantas que fornecem néctar, pólen, locais para larvas, oviposição, cópula (Corrêa *et al.*, 2001; De-Andrade e Freitas, 2005; Rios, 2013) e dormitórios (Brown Jr., 1981). Além disso, estimativas de endocruzamento em populações naturais dessa borboleta mostram um alto grau de parentesco entre os indivíduos de uma população (Di Mare e Araújo, 1986; Silva e Araújo, 1994) (embora Mallet (1986) tenha encontrado resultados diferentes). Sabendo que a dispersão dos indivíduos dessa espécie é baixa, e que existe reconhecimento de parentesco, de modo que o canibalismo lagarta-ovo ocorre preferencialmente entre não parentes, é esperado que indivíduos aparentados acasalem, o que explicaria o alto grau de parentesco entre os indivíduos. Isso nos remeteu ao estudo das consequências que o endocruzamento pode ter, abordando variáveis diferentes das já avaliadas por Di Mare e Araújo (1986). Comparando *H. erato* com outro heliconíneo, *Dryas iulia*, o número de equivalentes letais

por gameta nesta última foi de 2,92 a 3,26 para sobrevivência, valores bem maiores do que os que encontrados para *H. erato phyllis* (já a estimativa do coeficiente de endocruzamento nas populações de *D. iulia* foi similar a *H. erato*) (Haag e Araújo, 1994). A estrutura populacional (tipo ilha), juntamente com o pequeno tamanho populacional facilitaria a remoção de alelos deletérios (Oliveira e Araújo, 1982; Haag e Araújo, 1994). Logo, as consequências do endocruzamento observadas em *H. erato phyllis* existem, mas não são tão severas, visto o número de equivalentes letais encontrados para as variáveis analisadas (Capítulo 5). Em um nível populacional, o alto endocruzamento facilitaria a remoção de mutações deletérias (Silva e Araújo, 1994). O endocruzamento dentro das populações irá expor as mutações letais à seleção mais rapidamente do que em populações exocruzadas (Glémin *et al.*, 2003; Mezouk e Ross-Ibara, 2014), mas mutações fracamente deletérias podem ser mantidas em frequências moderadas, mesmo na presença de fluxo gênico entre as populações (Whitlock *et al.*, 2000; Mezouk e Ross-Ibara, 2014).

Fischer *et al.* (2015), em estudo com a borboleta tropical *Bicyclus anynana*, constataram que as fêmeas adultas discriminam parentes, e preferencialmente acasalam com não-parentes. Os autores sugerem que o reconhecimento de parentesco observado pode ser baseado em hidrocarbonetos cuticulares usados para auto-referenciamento. Não temos essa informação para *Heliconius erato phyllis*, mas em uma observação pontual nos viveiros, foi constatado que um macho, tendo a escolha entre acasalar com uma irmã e uma fêmea não-aparentada, acasalou com a irmã. Estudos seriam necessários para saber se existe esse reconhecimento entre adultos, mas, considerando que entre lagartas não é observada discriminação de parentesco (De Nardin *et al.* 2015), de modo que o sinal provavelmente está no córion, e que o coeficiente de endocruzamento nas populações é alto, a hipótese seria que não há reconhecimento entre adultos.

O estudo apresentado no capítulo 3 consiste em uma primeira abordagem para compreender as potenciais marcas químicas usadas no reconhecimento de parentesco em *H. erato phyllis*. Sabemos que os compostos extraídos dependem do solvente orgânico usado. Aqui utilizamos o solvente apolar hexano, que entre os solventes testados (diclorometano e pentano), foi o que apresentou a mais eficiente extração. Para uma confirmação de que os compostos aqui extraídos de fato têm importância no reconhecimento de parentesco, testes comportamentais usando esses compostos seriam interessantes. Entretanto, muitos dos compostos que diferem entre famílias, e que portanto

teriam potencial para estarem envolvidos no reconhecimento de parentesco, não puderam ser identificados. Porém, as dificuldades aqui reportadas não são exclusivas do presente trabalho. Muitos estudos que tratam da função dos hidrocarbonetos cuticulares como semioquímicos compartilham o problema geral que eles são meramente correlativos, isto é, eles concluem atividade comportamental dos hidrocarbonetos a partir da presença aparentemente exclusiva nos extratos bioativos de insetos (Kühbandner *et al.*, 2012). Apesar da importância crítica em mediar comportamentos em insetos, nós ainda sabemos pouco sobre os papéis e mecanismos dos compostos cuticulares como moléculas sinalizadoras, em parte porque não é imediatamente óbvio como sinais podem ser manipulados e explorados pelos insetos. Mesmo para as poucas espécies em que isso foi examinado em mais detalhe, há algumas lacunas no conhecimento, devido a alguns fatores como que quase todos os estudos usam cromatografia gasosa para analisar extratos lipídicos, usando as condições padrão que permitem compostos de em torno de 40 carbonos (C40) sejam detectados (Millar, 2010). Frequentemente negligencia-se que tais extratos possam conter outros compostos que poderiam contribuir com a atividade comportamental que não são detectados pelos métodos-padrão de GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry) (Millar, 2010). Tal classe de compostos é representada, por exemplo, pelos triacilgliceróis (Kühbandner *et al.*, 2012). Apesar de a maioria dos trabalhos utilizarem GC-MS, nossa análise foi feita por GC-FID (Gas chromatography–flame ionization detector), pois, segundo Grob (1995), GC-FID tem mais sensibilidade que GC-MS mesmo no modo *Single Ion Monitoring* (SIM). Utilizamos GC-MS posteriormente somente como uma tentativa de identificar os compostos. Além disso, a maioria dos estudos simplesmente lista os compostos presentes nos extratos, e em alguns casos compara o perfil de diferentes estágios do desenvolvimento, populações ou espécies. Poucos estudos fracionam os extratos para identificar compostos ativos biologicamente específicos, e então seguem a reconstrução de misturas a partir de compostos sintéticos pra verificar bioatividade (Millar, 2010). Mesmo em estudos que têm demonstrado a atividade comportamental a partir de hidrocarbonetos cuticulares purificados, a importância de compostos individuais ou classes de compostos tem frequentemente permanecido obscura (Sullivan, 2002; Steiner *et al.*, 2006; Ruther *et al.*, 2011). Não é totalmente compreendido se um conjunto de hidrocarbonetos cuticulares é percebido como um todo, ou se compostos-chave únicos são suficientes sozinhos ou em combinação para eliciar uma

resposta comportamental completa (Ginzl *et al.* 2003; Sugeno *et al.* 2006; Lacey *et al.* 2008; Silk *et al.* 2009). Kühbandner *et al.* (2012) mostraram que o 3-MeC27 é um componente-chave dos feromônios de contato sexuais que, entretanto, dispara o comportamento de cortejo somente se um *background* olfatório de outros lipídios cuticulares está presente. A identificação de compostos-chave presumidos nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares é frequentemente prejudicada pela complexidade desses perfis, a falta de compostos de referência sintéticos, e o fato que muitos hidrocarbonetos são metil-ramificados e então quirais (Millar, 2010; Hefetz *et al.*, 2010). Até agora, enantiômeros de metil-alcanos de cadeia longa não podem ser separados com ferramentas analíticas, e então a composição enantiomérica desses produtos naturais ainda permanece uma questão em aberto (Millar 2010; Hefetz *et al.* 2010). Conseqüentemente, embora hidrocarbonetos cuticulares metil-ramificados tenham sido identificados como feromônios de contato em algumas espécies (Ginzl *et al.*, 2003; Sugeno *et al.*, 2006; Lacey *et al.*, 2008; Sink *et al.*, 2009), é desconhecido se os insetos respondem aos compostos estereoseletivamente (Hefetz *et al.*, 2010), como no caso de muitos feromônios voláteis de insetos (Mori, 2007; Kühbandner *et al.*, 2012). Apesar dessas dificuldades, consideramos que os dados apresentados no Capítulo 3 constituem um primeiro passo importante na elucidação das marcas químicas envolvidas no reconhecimento de parentesco.

Questões que têm fascinado os geneticistas evolutivos no último século incluem: “Quantos genes determinam a variação genética quantitativa?”, “Os genes principais (aqueles que individualmente explicam uma grande proporção da variância fenotípica) são comuns?”, “Genes individuais explicam a variação em diversas características (pleiotropia)?”, “São os mesmos genes responsáveis pela variação através de populações, ou mesmo através de espécies?”, “A ação gênica depende do ambiente?”, “Quais são os genes responsáveis pela variação fenotípica, adaptação e especiação?”, “Quais são as forças evolutivas que mantém a variação genética?” (Barton e Turelli, 1989; Slate, 2005). Essas perguntas nos dão uma ideia de quão complexos são os estudos em genética quantitativa, reforçando que os resultados aqui obtidos são apenas iniciais, mas ainda assim importantes.

Usar um grande número de marcadores é essencial para aumentar as possibilidades de atingir regiões genômicas ou proximamente ligadas, causativamente associadas com a característica fenotípica sob consideração (Herrera *et al.*, 2012). Aqui utilizamos um

número razoável para uma primeira abordagem, mas certamente mais marcadores seriam necessários, principalmente mais microssatélites, para uma melhor compreensão de onde (em quais cromossomos) estão os locos associados aos comportamentos avaliados. Isso seria de bastante importância para uma futura construção de um mapa de ligação, para fazer de fato o mapeamento dos locos de características quantitativas, e enriquecer regiões de interesse com mais marcadores. Uma limitação da análise de um único marcador utilizada nesta tese é que ela falha em fornecer a localização precisa do QTL, ou a frequência de recombinação entre o marcador e o QTL. Isso ocorre porque o efeito do QTL e sua localização são confundidos, ou são incapazes de serem estimados separadamente (Doerge, 2002). Assim, o que fizemos neste trabalho foi apenas uma busca preliminar de possíveis associações entre genótipo e fenótipo, e não propriamente o mapeamento dos QTLs, já que para isso seria necessária uma única população segregante, originada de um cruzamento entre indivíduos de fenótipos contrastantes, e com uma prole bastante numerosa, de no mínimo de 50 a 250 indivíduos para um mapeamento preliminar (Collard *et al.*, 2005), o que não foi possível aqui. Para o posicionamento correto dos locos em um mapa de ligação em Lepidoptera é necessário considerar que o *crossing over* entre cromossomos homólogos ocorre durante a meiose e formação de gametas em machos, mas não em fêmeas (Turner e Sheppard, 1975; Baxter *et al.*, 2009). Cada cromossomo derivado de fêmea permanece intacto em sua prole, com todos os genes e marcadores no mesmo cromossomo, completamente ligados. Cruzamentos entre diferentes características fenotípicas possibilitam a segregação da característica de interesse. Além disso, outra consideração importante é usar experimentos de acasalamento de um único casal (*single-pair mating*), visto que pode ser extremamente difícil determinar os padrões de segregação onde muitos cruzamentos estão envolvidos (Baxter *et al.*, 2009).

Existem mapas de ligação já feitos para *Heliconius melpomene* (Jiggins *et al.*, 2005) e *Heliconius erato* (Tobler *et al.*, 2005; Kapan *et al.*, 2006). Através desses trabalhos, foi possível estipular o tamanho do genoma dessas espécies, que possuem 21 cromossomos: 1616 cM para *H. melpomene* e 292 Mb (Jiggins *et al.*, 2005), e 2400 cM e 395 Mb para *H. erato* (Tobler *et al.*, 2005). Entretanto, todos adotam a metodologia de usar um cruzamento entre indivíduos contrastantes para a característica avaliada (entre subespécies ou mesmo espécies diferentes), e avaliam uma grande prole, com mais de 70 indivíduos, obtida a partir desse cruzamento. Aqui isso não foi possível por inúmeras

razões: (i) ao delineamento amostral adotado: a detecção do fenótipo depende de testes de canibalismo, que usa três ovos para cada teste, onde muitos ovos são canibalizados, logo nem toda prole gerada pela borboleta chegará à fase adulta; (ii) a anulação de inúmeros testes, seja por dúvida quanto a detecção do canibalismo, ultrapassagem do tempo estipulado para a duração do teste e ovos que secaram durante a realização do teste; (iii) muitas fêmeas morreram precocemente; (iv) muitas fêmeas não colocam muitos ovos; (v) mortalidade dos imaturos. É importante destacar que todos os mapas de ligação são únicos e produto da população de mapeamento utilizada (derivada de dois pais específicos) e dos tipos de marcadores usados (Collard *et al.*, 2005). Mesmo que aqui não tenha sido feito um mapa de ligação, e tenham sido usados diversos cruzamentos, entre indivíduos de diversas populações, não podemos afirmar que todas as associações aqui encontradas necessariamente serão observadas em outros indivíduos, de outras populações avaliadas.

O número de vezes que genes individuais têm sido identificados seguindo estudos de mapeamento de QTL permanece pequeno. De fato, Roff (2007) lista 15 exemplos de características quantitativas nas quais um único gene tem efeito principal e sua base molecular foi estudada, e ele destaca que esse número é modesto relativo ao esforço investido em estudos de QTL. Quando associações estatisticamente significativas entre características quantitativas complexas e marcadores moleculares são identificadas, as regiões genômicas são usualmente tão grandes que experimentos subsequentes são frequentemente caros. Além disso, um subconjunto de genes que se acredita contribuir para a variação tem frequentemente fornecido uma porcentagem limitada da variação total associada com a característica (Doerge, 2002). Identificar os locos atuais que afetam uma característica quantitativa envolve demonstrar causalidade usando técnicas como clonagem posicional seguida pela troca do gene alvo. Frequentemente, a busca por genes individuais dentro de um QTL é auxiliada pela identificação de genes candidatos a priori usando genética clássica reversa ou bioinformática. Uma relação funcional entre um gene candidato e o QTL deve então ser demonstrada, como por usar complementação funcional (a adição de DNA complementar tipo-selvagem do gene em questão dentro do núcleo para resgatar uma mutação perda-de-função ou para produzir um fenótipo alternativo). Outras técnicas, como mapeamento de deleção são disponíveis para organismos específicos, incluindo *Drosophila* (Mackay, 2001) (Miles e Wayne, 2008).

A genômica tem trazido um novo nível de esperança para desenredar os segredos das características complexas. Sequências genômicas tem o potencial de fornecer uma lista compreensiva de genes em um organismo. Abordagens genômicas funcionais podem ser usadas para gerar informação sobre a função gênica, bem como dados sobre as interações gênicas, não apenas entre e dentro de genes complexos, mas também em resposta a estímulos ambientais (Doerge, 2002). Abordagens genômicas enfatizam a natureza dinâmica do genoma, correlacionando padrões de expressão do gene, não apenas variação alélica, com o fenótipo comportamental. Essa perspectiva enfatiza o fato que o genoma, como o comportamento, é tanto herdável como ambientalmente responsivo (Flint, 2003; Robinson, 2004; Mackay *et al.*, 2005). A genômica tem as ferramentas para sequenciar ou medir a expressão de milhares de genes simultaneamente, o que dá aos pesquisadores a capacidade de experimentalmente considerar o fato já conhecido de que comportamentos frequentemente envolvem muitos genes de pequeno efeito que interagem em vias complexas (Sokolowski, 2001; Flint, 2003; Robinson *et al.*, 2008; Kültz *et al.*, 2013). Esses avanços, com a expansão de recursos genômicos para organismos não-modelo, cria uma oportunidade para ecólogos comportamentais aplicarem a perspectiva genômica para suas questões de pesquisa (Rittschof e Robinson, 2014).

Em uma busca por genes candidatos envolvidos no altruísmo e no reconhecimento de parentesco em *Heliconius erato phyllis*, seria importante estudar-se, inicialmente, os genes responsáveis pela produção das marcas químicas, como hidrocarbonetos, bem como os genes responsáveis pela recepção desses sinais. Insetos sociais, especialmente formigas, abelhas e vespas, são bastante estudados com relação a este aspecto. Formigas (*Pogonomyrmex barbatus*, *Linepithema humile*, *Harpegnathos saltator* e *Camponotus floridanus*) possuem de 300 a mais de 400 receptores de odor (Ors), abelhas *Apis mellifera* contém 174 genes Or e a vespa *Nasonia vitripennis* tem 301 genes Or. Receptores gustatórios (Grs), que são bastante usados para quimiorrecepção, são também muito diversos e podem ancorar genes que são usados para detecção de marcas de reconhecimento de colônias. Em *Drosophila*, por exemplo, Grs têm sido relacionados à detecção de hidrocarbonetos de fêmeas por moscas machos durante o cortejo. Ainda existem os receptores quimiosensoriais, relacionados a receptores de glutamato ionotrópico ('ionotropic receptors'; IRs), que são uma terceira família de genes que podem incluir quimiorreceptores para marcas de reconhecimento. A família do gene IR é antiga,

visto que os genes IR estão distribuídos através de uma ampla gama de animais nos Protostomia (incluindo moluscos e nematódeos). Diferente dos Ors e Grs, IRs são canais iônicos de abertura ativada por ligante, que funcionam como quimiorreceptores transmembrana. Entretanto, como visto em ORs e GRs, IRs são mais abundantes em formigas (23-32 genes) do que *Apis* ou *Nasonia* (10 genes IR em ambos) (revisado por Tsutsui, 2003). A busca por essas informações em Lepidoptera e especificamente em *Heliconius erato phyllis*, utilizando ferramentas de bioinformática e o genoma disponível (The *Heliconius* Genome Consortium 2012), constituiriam um próximo passo para o estudo aqui realizado.

Referências

- Barton NH and Turelli M (1989) Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? *Annu Rev Gen* 23:337–370.
- Baxter S, McMillan O, Chamberlain N, Ffrench-Constant RH and Jiggins C (2009) Prospects for locating adaptive genes in Lepidopteran genomes *A case study of butterfly color patterns*. In: Goldsmith MR and Marec F (eds) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera (Contemporary Topics in Entomology Series)*. CRC Press, Boca Raton, pp 105-120.
- Blumstein DT, Nguyen KT and Martin JGA (2013) Ontogenetic variation of heritability and maternal effects in yellow-bellied marmot alarm calls. *Proc R Soc B* 280: 20130176. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0176>.
- Breed MD (2014) Kin and nestmate recognition: the influence of W. D. Hamilton on 50 years of research. *Anim Behav* 92:271-279. doi:10.1016/j.anbehav.2014.02.030.
- Breed MD, Garry MF, Pearce AN, Hibbard BE, Bjostad LB and Page Jr, RE (1995) The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Anim Behav* 50:489–496.
- Breed MD and Buchwald R (2008) Cue diversity and social recognition. In: Gadau J and Fewell JH (eds) *Organization of insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, pp 171-192.
- Brennan PA and Kendrick KM (2006) Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci* 361:2061-2078.

- Brown Jr. KS (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annu Rev Entomol* 26:427-456.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB and Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-1685.
- Corrêa CA, Irgang BE and Moreira GRP (2001) Estrutura floral das angiospermas usadas por *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér Zool* 90:71-84.
- De-Andrade RB and Freitas AVL (2005) Population Biology of two species of *Heliconius* (Nymphalidae: Heliconiinae) in a semi-deciduous forest in southeastern Brazil. *J Lepid Soc* 59(4):223- 228.
- De Nardin J and Araújo AM (2011) Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *J Ethol* 29:499–503.
- De Nardin J (2012) A evolução do comportamento canibal e não-canibal em imaturos de *Heliconius erato phyllis* e evidências da herança do reconhecimento de parentesco lagarta-ovo. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- De Nardin J, Missaggia BO and Araújo AM (2015) An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures. *Ethol Ecol Evol* 27:294–305. doi: 10.1080/03949370.2014.946539.
- Di Mare RA and Araújo AM (1986) A first survey of inbreeding effects in *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Rev Bras Genet* 9:11-20.
- Doerge RJ (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev* 3:43-52.
- Fischer K, Karl I Heuskin S, Janowitz S and Dötterl S (2015) Kin Recognition and Inbreeding Avoidance in a Butterfly. *Ethol* 121:1–8. doi: 10.1111/eth.12410.
- Flint J (2003) Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J Neurobiol* 54:46-77.
- Ginzel MD, Blomquist GJ, Millar JG and Hanks LM (2003) Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *J Chem Ecol* 29:533-545.

- Glémin S, Ronfort J and Bataillon T (2003) Patterns of inbreeding depression and architecture of the load in subdivided populations. *Genetics* 165(4):2193-2212.
- Grafen A (1990) Do animals really recognise kin? *Anim Behav* 39:42-54.
- Grob RL (1995) *Modern Practice of gas chromatography*. 3rd edition. John Wiley e Sons Inc, New York.
- Grosberg RK and Quinn JF (1986) The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. *Nature* 322:456-459.
- Haag KL and Araújo AM (1994) Inbreeding, genetic load and morphometric variation in *Dryas iulia*. *Rev Bras Gen* 17:35-39.
- Hain TJA and Neff BD (2006) Promiscuity drives self-referent kin recognition. *Curr Biol* 16:1807-1811.
- Hain TJA and Neff BD (2007) Multiple paternity and kin recognition mechanisms in a guppy population. *Mol Ecol* 16:3938–3946. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03443.x.
- Hamilton WD (1964a) Genetical evolution of social behavior. I *J Theor Biol* 7: 1-16.
- Hamilton WD (1964b) Genetical evolution of social behavior. II. *J Theor Biol* 7:17-52.
- Hefetz A, Wicker-Thomas C and Bagnères AG (2010) Future directions in hydrocarbon research. In: Blomquist GJ and Bagnères AG) (eds) *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 477-485.
- Herrera CM (2012) Genomic scan as a tool for assessing the genetic component of phenotypic variance in wild populations. In: Pompanon F and Bonin A (eds) *Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 888, Springer Science+Business Media, New York. doi 10.1007/978-1-61779-870-2_18
- Insley SJ (2000) Long-term vocal recognition in the northern fur seal. *Nature* 406:404-405.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltrán M, McMillan WO, Johnston JS and Bermingham, E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171: 557–570. DOI: 10.1534/genetics.104.034686
- Johnston RE (2003) Chemical communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *J Mammal* 84:1141-1162.

- Jones G and Ransome RD (1993) Echolocation calls of bats are influenced by maternal effects and change over a lifetime. *Proc R Soc Lond B* 252:125–128. doi:10.1098/rspb.1993.0055
- Kapan DD, Flanagan NS, Tobler A, Papa R, Reed RD, Gonzalez JA, Restrepo MR, Martinez L, Maldonado K, Ritschoff C, Heckel DG and McMillan WO (2006) Localization of Müllerian mimicry genes on a dense linkage map of *Heliconius erato*. *Genetics* 173: 735–757. DOI: 10.1534/genetics.106.057166.
- Kühbandner S, Sergej S, Mori K and Ruther J (2012) Deciphering the signature of cuticular lipids with contact sex pheromone function in a parasitic wasp. *J Exp Biol* 215: 2471-2478. doi:10.1242/jeb.071217.
- Kültz D, Clayton DF, Robinson GE, Albertson C, Carey HV, Cummings M, et al. (2013) New frontiers for organismal biology. *Bioscience* 63:464-471.
- Lacey ES, Ginzel MD, Millar JG and Hanks LM (2008) 7-Methylheptacosane is a major component of the contact sex pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. *Physiol Entomol* 33:209-216.
- Lihoreau M and Rivault C (2009) Kin recognition via cuticular hydrocarbons shapes cockroach social life. *Behav Ecol* 20:46-53.
- Mackay TFC (2001) Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nat Rev Gen* 2: 11–20.
- Mackay TF, Heinsohn SL, Lyman RF, Moehring AJ, Morgan TJ and Rollmann SM (2005) Genetics and genomics of *Drosophila* mating behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(Suppl.1):6622-6629.
- Mallet J (1986) Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behaviour: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecol* 68:210-217.
- Marechal L, Genty E and Roeder JJ (2010) Recognition of faces of known individuals in two lemur species (*Eulemur fulvus* and *E. macaco*). *Anim Behav* 79:1157-1163.
- Mateo JM (2003) Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *J Mammal* 84:1163-1181.
- Mateo JM (2004) Recognition systems and biological organization: the perception component of recognition. *Ann Zool Fenn* 41:729-745.
- Mateo JM (2010) Self-referent phenotype matching and long-term maintenance of kin recognition. *Anim Behav* 80:929-935.

- Mateo JM and Johnston RE (2000) Kin recognition and the ‘armpit effect’: evidence of self-referent phenotype matching. *Proc R Soc B: Biol Sci* 267:695-700.
- Mateo JM and Johnston RE (2003) Kin recognition by self-referent phenotype matching: weighing the evidence. *Anim Cogn* 6: 73-76.
- Mezmouk S and Ross-Ibarra J (2014) The pattern and distribution of deleterious mutations in maize. *G3 (Bethesda)* 4:163–171.
- Miles C and Wayne M (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1):208.
- Millar JG (2010) Chemical synthesis of insect cuticular hydrocarbons. In: Blomquist GJ and Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 163-186.
- Mori K (2007) Significance of chirality in pheromone science. *Bioorg Med Chem* 15: 7505-7523.
- Neff BD and Sherman PW (2003) Nestling recognition via direct cues by parental male bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Anim Cogn* 6:87-92.
- Oliveira DL and Araújo AM (1982) Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepidoptera; Nymphalidae). IV. Effective size and variability of the red raylets in natural populations. *Rev Bras Gen* 15:789-799.
- Platek SM, Krill AL and Kemp SM (2008) The neural basis of facial resemblance. *Neurosci Lett* 437:76-81.
- Ramos RR and Freitas AVL (1999) Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* Nymphalidae). *J Lepid Soc* 53:11-2. <http://biostor.org/reference/115780>.
- Reeve HK (1989) The evolution of conspecific acceptance thresholds. *Am Nat* 133:407-435.
- Rios GG, Silva MG, Paiva DAR, Santos JR, Alvarenga PP, Miranda NC, Lange D and Stefani V (2013) Population structure of two species of *Heliconius* Kluk, 1780 butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biosci J* 29(5):1350-1360.
- Rittschof CC and Robinson GE (2014) Genomics: moving behavioural ecology beyond the phenotypic gambit. *Anim Behav* 92:263-270. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.02.028.
- Robinson GE (2004) Beyond nature and nurture. *Science* 304:397-399.

- Robinson GE, Fernald RD and Clayton DF (2008) Genes and social behavior. *Science* 322:896-900.
- Roff DA (2007) A centennial celebration for quantitative genetics. *Evolution* 61:1017–1032.
- Rousset F and Roze D (2007) Constraints on the origin and maintenance of genetic kin recognition. *Evolution* 61:2320-2330.
- Ruther J, Döring M and Steiner S (2011) Cuticular hydrocarbons as contact sex pheromone in the parasitoid *Dibrachys cavus*. *Entomol Exp Appl* 140:59-68.
- Scherrer JA and Wilkinson GS (1993) Evening bat isolation calls provide evidence for heritable signatures. *Anim Behav* 46:847–860. doi:10.1006/anbe.1993.1270
- Sherman PW (1991). Multiple mating and kin recognition by self-inspection. *Ethology and Sociobiology* 12:377-386.
- Sherman PW, Reeve HK and Pfennig DW (1997) Recognition systems. In: Krebs JR, Davies NB (eds) *Behavioural Ecology: An evolutionary approach*. Blackwell, Oxford, pp 69-98.
- Silk PJ, Ryall K, Lyons DB, Sweeney J and Wu JP (2009) A contact sex pheromone component of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Naturwissenschaften* 96:601-608.
- Silva LM and Araújo AM (1994) The genetic structure of *Heliconius erato* populations (Lepidoptera; Nymphalidae). *Rev Bras Genet* 17:19-24.
- Slate J (2005) Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. *Mol Ecol* 14:363–379. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02378.x.
- Sokolowski MB (2001) *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Gen* 2:879-890.
- Steiner S, Hermann N and Ruther J (2006) Characterization of a femaleproduced courtship pheromone in the parasitoid *Nasonia vitripennis*. *J Chem Ecol* 32:1687-1702.
- Sugeno W, Hori M and Matsuda K (2006) Identification of the contact sex pheromone of *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Appl Entomol Zool* 41:269-276.
- Sullivan BT (2002) Evidence for a sex pheromone in bark beetle parasitoid *Roptrocercus xylophagorum*. *J Chem Ecol* 28:1045-1063.

- Swaisgood RR, Lindburg DG and Zhou X (1999) Giant pandas discriminate individual differences in conspecific scent. *Anim Behav* 57:1045-1053.
- Takayama S and Isogai A (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56: 467-489.
- The *Heliconius* Genome Consortium (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*: 487(7405):94-98.
- Thunken T, Waltschky N, Bakker TCM and Kullmann H (2009) Olfactory self recognition in a cichlid fish. *Anim Cogn* 12:717-724.
- Tibbetts EA and Dale J (2007) Individual recognition: it is good to be different. *Trends Ecol Evol* 22:529-537.
- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E, Jiggins CD, Johnson JS Heckel DG and McMillan WO (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94:408–417. doi:10.1038/sj.hdy.6800619.
- Tsutsui ND (2013) Dissecting ant recognition systems in the age of genomics. *Biol Lett* 9:20130416. doi:10.1098/rsbl.2013.0416.
- Turner JRG and Sheppard PM (1975) Absence of crossing-over in female butterflies (*Heliconius*). *Heredity* 34: 265–269.
- Uyenoyama MK, Feldman MW and Mueller LD (1981) Population genetic theory of kinselection: multiple alleles at one locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5036-5040.
- Villinger J and Waldman B (2008) Self-referent MHC type matching in frog tadpoles. *Proc R Soc B Biol Sci* 275:1225-1230.
- Whitlock M, Ingvarsson P and Hatfield T (2000) Local drift load and the heterosis of interconnected populations. *Heredity* 84:452-457.
- Yorzinski JL, Vehrencamp SL, Clark AB and McGowan KJ (2006) The inflected alarm call of the American crow: differences in acoustic structure among individuals and sexes. *Condor* 108: 518-529.